



Title	抗体高生産株構築に向けたチャイニーズハムスター由来細胞の分泌プロセスに関する研究
Author(s)	角田, 悠
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105399
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

博士学位論文

抗体高生産株構築に向けたチャイニーズハムスター由来
細胞の分泌プロセスに関する研究

角田 悠

2025 年 12 月

大阪大学大学院 工学研究科 生物工学専攻
生物化学工学領域 大政研究室

目次	
略語.....	5
第一章 序論.....	6
1.1 抗体.....	6
1.1.1 Immunoglobulin G (IgG) 抗体.....	6
1.1.2 抗体医薬品.....	7
1.1.3 次世代抗体医薬品.....	8
1.2 抗体医薬品の生産宿主細胞.....	10
1.2.1 チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を用いた抗体医薬品生産.....	10
1.2.2 抗体生産株構築.....	11
1.2.3 新規樹立チャイニーズハムスター肺 (CHL-YN) 細胞.....	12
1.3. 抗体分泌プロセス.....	13
1.3.1 抗体生産 CHO 細胞の分泌プロセス.....	13
1.3.2 分泌プロセスに関するセルエンジニアリング.....	14
1.3.3. 分泌プロセスに関する課題.....	15
1.4 本博士論文の構成.....	16
第二章 Sar1A の過剰発現が CHO 細胞の抗体生産と分泌プロセスへ与える影響.....	18
2.1 序論.....	18
2.2 実験材料および実験方法.....	19
2.2.1 細胞培養.....	19
2.2.2 Sar1A 過剰発現ベクターの構築.....	19
2.2.3 Sar1A 過剰発現細胞の構築.....	20
2.2.4 回分培養.....	20
2.2.5 mRNA 発現の定量.....	20
2.2.6 抗体濃度の定量.....	21
2.2.7 比増殖速度および比生産速度の計算.....	22
2.2.8 翻訳阻害剤 Cycloheximide (CHX) 添加アッセイ.....	22
2.2.9 蛍光免疫染色法および画像解析.....	23
2.2.10 質量分析による糖鎖解析.....	25
2.3 結果.....	26
2.3.1 Sar1A 過剰発現株の抗体生産の評価.....	26
2.3.2 Sar1A の過剰発現が CHO 細胞の抗体生産を強化したメカニズムの解析.....	27
2.3.3 糖鎖解析.....	33
2.3.4 Sar1A の過剰発現の異なる抗体生産 CHO 細胞への応用.....	34
2.4 考察.....	36
第三章 合理的な分泌プロセス強化に向けた人工ボトルネックの評価と応用.....	40

3.1 序章	40
3.2 実験材料および実験方法	41
3.2.1 細胞培養	41
3.2.2 ノックダウンベクターと過剰発現ベクターの構築.....	42
3.2.3 ノックダウン細胞と過剰発現細胞の構築	44
3.2.4 シングルセルクローニング	45
3.2.5 回分培養	46
3.2.6 小胞輸送阻害剤 Brefeldin A (BFA)添加・除去アッセイ	46
3.2.7 翻訳阻害剤 Cycloheximide (CHX)添加・除去アッセイ	47
3.2.8 定量的ウェスタンブロット	47
3.3. 結果	48
3.3.1 人工分泌ボトルネックが抗体の比生産速度へ与える影響の評価.....	48
3.3.2 人工分泌ボトルネックが細胞内抗体の蓄積に与える影響の解析.....	52
3.3.3 人工分泌ボトルネックが細胞内抗体の分泌に与える影響の解析.....	55
3.3.4 CHX と BFA を用いた 3 種類の抗体生産株の分泌プロファイルの評価	57
3.3.5 セルエンジニアリングによる分泌プロセス強化が抗体生産へ与える影響の評価	60
3.4 考察	63
3.4.1 人工分泌ボトルネックが抗体の比生産速度へ与える影響に関する考察.....	64
3.4.2 人工分泌ボトルネックが細胞内抗体の蓄積と分泌に与える影響に関する考察.....	64
3.4.3 分泌プロファイルを用いた 3 種類の抗体生産株の分泌ボトルネックの推定と推定 の妥当性の検証.....	66
第四章 新規抗体生産宿主 CHL-YN 細胞の分泌プロセスに関する網羅的解析	70
4.1 序章	70
4.2 実験材料および実験方法	70
4.2.1 細胞培養	70
4.2.2 細胞内転写物の RNA-seq	71
4.2.3 RNA-seq のデータプロセッシング	71
4.2.4 細胞内タンパク質の質量分析.....	71
4.2.5 プロテオームのデータプロセッシング	72
4.2.6 GO/KEGG パスウェイエンリッチメント解析によるトランスクリプトミクス.....	73
4.2.7 GO/KEGG パスウェイエンリッチメント解析によるプロテオミクス	73
4.2.8 mRNA およびタンパク質発現量の比較.....	73
4.3 結果	74
4.3.1 CHL-YN 細胞と CHO 細胞のトランスクリプトミクスの比較.....	74
4.3.2 CHL-YN 細胞と CHO 細胞のプロテオミクスの比較.....	78

4.3.3 各細胞の特徴的なプロセス及びパスウェイの遺伝子発現量の比較	81
4.4 考察	84
第五章 総括と今後の展望	89
5.1 本研究の総括	89
5.1.1 各章の総括	89
5.1.2 本研究全体の総括	90
5.2 今後の展望	92
参考文献	95
学術論文発表	112
謝辞	113

略語

IgG: immunoglobulin G (イムノグロブリン G), HC: heavy chain (重鎖), LC: light chain (軽鎖), Fab region: fragment antigen binding region (フラグメント抗原結合領域), Fc region: fragment crystallizable region (フラグメント結晶化可能領域), ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (抗体依存性細胞傷害), CDC: complement-dependent cytotoxicity (補体依存性細胞傷害), FDA: Food and Drug Administration (アメリカ食品医薬品局), EC: European Commission (欧州委員会), BiTE: bi-specific T-cell engager (二重特異性 T 細胞誘導), scFv: single-chain variable fragment (短鎖可変領域フラグメント), ADC: antibody-drug conjugate (抗体薬物複合体), CHO cell: Chinese hamster ovary cell (チャイニーズハムスター卵巣細胞), rt-PA: recombinant tissue-type plasminogen activator (組換え組織型プラスミノゲン活性化因子), CDM: chemically defined medium (化学合成培地), DHFR: dihydrofolate reductase (デヒドロ葉酸レダクターゼ), GS: glutamine synthetase (グルタミンシンテターゼ), CMV: human cytomegalovirus (ヒトサイトメガロウイルス), SV40: simian virus 40 (シミアンウイルス), UPR: unfolded protein response (小胞体ストレス応答), CHL-YN cell: Chinese hamster lung-YN cell (チャイニーズハムスター肺細胞), LC-MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry (液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法), ERAD: ER-associated degradation (小胞体関連分解), DEG: differentially expressed gene (発現変動遺伝子), GO: gene ontology (遺伝子オントロジー), KD: knockdown (ノックダウン), CHX: cycloheximide (シクロヘキシミド), BFA: brefeldin A (ブレフェルジン A), VCC: viable cell concentration (生細胞濃度), PCR: polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応), FBS: fetal bovine serum (ウシ胎児血清), ELISA: enzyme-linked immuno sorbent assay (酵素結合免疫吸着測定), BSA: bovine serum albumin (ウシ血清アルブミン), PBS: phosphate-buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水), RIPA buffer: radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA バッファー), SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate – poly-acrylamide gel electrophoresis (ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動), PCC: Pearson's correlation coefficients (ピアソンの相関係数), MCC: Manders' colocalization coefficient (マンダースの相関係数), SRP: signal recognition particle (シグナル認識粒子), RNA-seq: RNA sequencing (RNA シーケンシング), TPM: transcripts per million, TEAB: triethylammonium bicarbonate (トリエチルアンモニウム重炭酸塩), DTT: dithiothreitol (ジチオスレイトール), FDR: false discovery rate (偽発見率), TMT: tandem mass tag (タンデムマスタグ), RPLC: reverse-phase liquid chromatography (液体クロマトグラフィー), One-way ANOVA: one-way analysis of variance (一元配置分散分析), KEGG: Kyoto Encyclopedia Genes and Genome (KEGG), BH: Benjamini-Hochberg (ベンジャミン・ホックバーグ)

第一章 序論

1.1 抗体

1.1.1 Immunoglobulin G (IgG) 抗体

免疫グロブリン G (Immunoglobulin G, IgG) はヒトの血清の中に最も多く存在する抗体クラスであり、IgA, IgM, IgE, IgD を含む免疫グロブリン全体の割合の約 80% を占めている¹。IgG は 2 つの重鎖 (heavy chain, HC) と 2 つの軽鎖 (light chain, LC) からなる 4 量体であり、約 150 kDa の分子量を有する²。2 つの HC と 2 つの LC はそれぞれジスルフィド結合で共有結合し、Y 字型と表現される構造を取る (図 1)³。タンパク質分解酵素パパインによって切断される Y 字型の 2 つの“腕”にあたる領域はフラグメント抗原結合 (fragment antigen binding, Fab) 領域と呼ばれ、抗原認識部位 (antigen binding site) を介して抗原を特異的に認識し、結合する⁴。Fab 領域は可変 (variable, V) 領域と定常 (constant, C) 領域から構成される。また、パパインによって切断される Y 字型の“足”に当たる領域は HC の C 領域のみで構成され、フラグメント結晶化可能 (fragment crystallizable, Fc) 領域と呼ばれており、細胞表面にある Fc 受容体に結合し、免疫エフェクター細胞の動員を通じて抗体依存性細胞傷害 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 活性等に関与する⁵。Fc 領域の C_{H2} ドメイン (図 1) には N 結合型糖鎖修飾が存在し、IgG 抗体の構造安定性に関与するだけでなく、ADCC 活性や補体依存性細胞傷害 (complement-dependent cytotoxicity, CDC) 活性にも影響を与える。生体内では、抗原に反応して増殖した B 細胞から最終的に分化した形質細胞が IgG 抗体を分泌する役割を担っている⁶。分泌された IgG 抗体は Fab 領域の多様な構造によりウイルスや細菌、アレルギー物質などの抗原に特異的に結合し、様々な作用機序によりそれらの抗原を排除する。IgG 抗体の中和作用は体内に侵入したウイルス等の病原体に結合し、抗原の立体構造の変化や動きの制限を通じて抗原の病原体としての生物学的活性を無効化する⁷。また、IgG 抗体は病原体の表面に位置する抗原に結合し、IgG の Fc 領域がマクロファージ等の食細胞表面の Fc 受容体に結合することで貪食作用を促進するオプソニン化を通じて病原体を排除する⁸。IgG 抗体は補体系の活性化や免疫エフェクター細胞を呼び寄せることでも標的細胞を破壊することが可能である。補体系の活性化を通じた CDC では、IgG 抗体が標的に結合すると、その Fc 領域に血中の補体タンパク質の一つである C1q が結合し、補体系の古典経路と呼ばれるカスケード反応を通じて、最終的に標的細胞は破壊される⁹。ADCC では、標的細胞へ結合した IgG 抗体の Fc 領域にナチュラルキラー細胞等の免疫エフェクター細胞が Fc 受容体を介して結合することで、その免疫エフェクター細胞は活性化され、標的細胞を破壊する⁹。

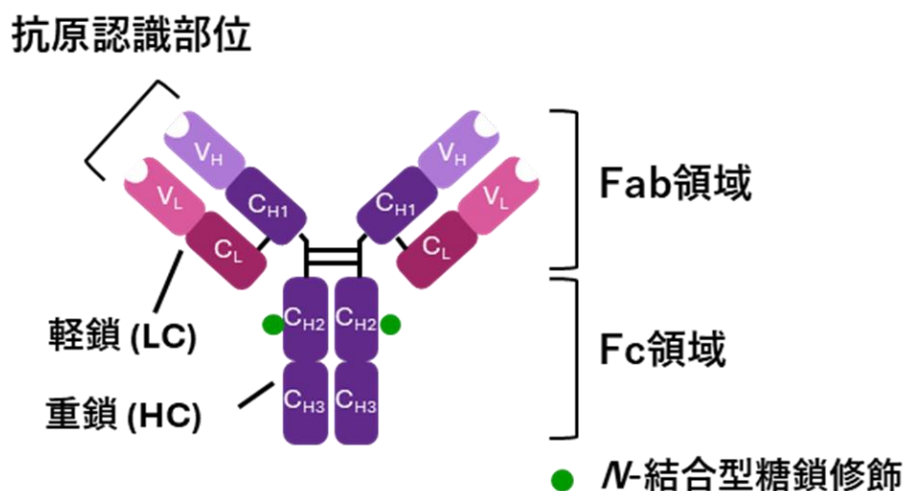


図1 抗体の分子構造の模式図

1.1.2 抗体医薬品

1986 年、腎臓移植における拒絶反応を抑制するモノクローナル抗体医薬品、muromonab-CD3 が初めてアメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration, FDA) に承認されて以降、IgG 抗体の様々な生物学的機能を用いた数多くの抗体医薬品が今日までに研究、開発、そして上市されている。初めて FDA に承認された muromonab-CD3 はマウス抗体であるため、高い主作用を有する一方で、免疫原性による副作用も確認された¹⁰。このような抗体の由来となる種族に起因する免疫原性を低減するため、これまでマウス抗体とヒト抗体の配列をともに含むキメラ抗体やヒト化抗体、ヒト由来の抗体である完全ヒト抗体などが設計されている。キメラ抗体はマウス抗体の可変領域とヒト抗体の定常領域を組み合わせた抗体であり、マウス抗体よりも免疫原性が低い¹¹。ヒト化抗体はマウス抗体の可変領域のうち、抗原結合部位以外をヒト由来に置換した抗体であり、免疫原性は低減されているものの、可変領域の構造の変化により抗原への特異性が低下する可能性がある¹²。完全ヒト抗体の免疫原性は一般的に非常に低い、可変領域の配列依存的に免疫原性を示すことも報告されている¹³。IgG は Fc 領域を構成する HC のアミノ酸配列の違いにより、IgG₁ や IgG₂、IgG₃、IgG₄ といった複数のサブクラスで構成されるが、その中でも特に IgG₁ は抗体医薬品として広く用いられており、その理由には先述の IgG 抗体の生物学的機能がより強く働くことや安定性の高さ、平均的な血中半減期が約 3 週間とサブクラスの中で最も長いことなどが挙げられる^{14,15}。これまでに上市された TNF- α を中和し、炎症性サイトカインを阻止する中和抗体、adalimumab¹⁶ や HER2 陽性がん細胞に対する ADCC 活性のある trastuzumab¹⁷、ADCC 活性と CDC 活性を主作用とし、CD20 を標的とするがんや自己免疫疾患の治療薬、rituximab¹⁸ はいずれも累計売上が 500 億ドルを超える IgG₁ 抗体医薬品である^{19,20}。2021 年時点で、世界の抗体医薬品の市場規模は 2000 億ド

ル以上とされており、2020年代は年間約15%の成長率となることが予測されている²¹⁻²³。
 FDA や欧州委員会（European Commission, EC）に承認される抗体医薬品の数は年々増加し、2022年6月までにFDAとECはそれぞれ111と106の抗体医薬品を²¹、PMDAは2022年12月までに89の抗体医薬品²⁴を承認しており（図2）、今後も抗体医薬品の市場は拡大していくと見込まれる。

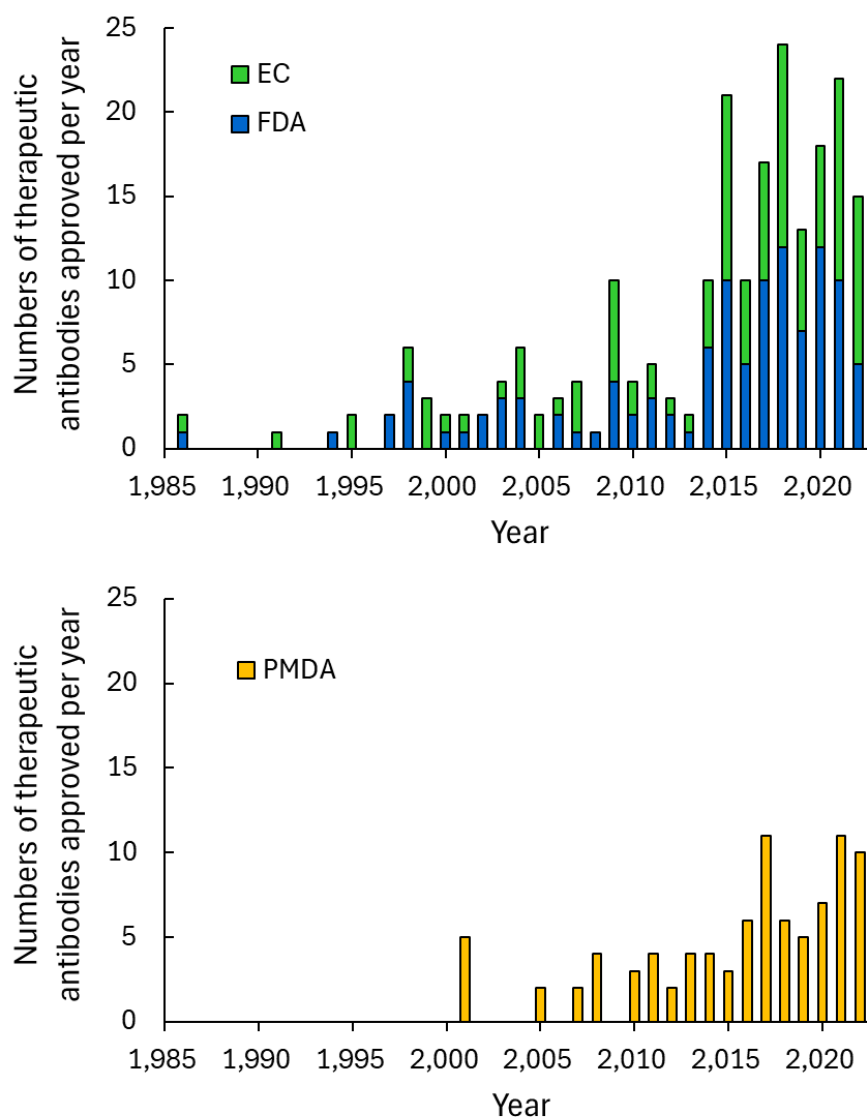


図2 これまでにFDA、EC、およびPMDAで承認された抗体医薬品数

1.1.3 次世代抗体医薬品

従来型の抗体医薬品に加え、近年では抗体の特徴を活かしながらも、目的に応じ

て高度にエンジニアリングされた、いわゆる次世代抗体医薬品が多く研究、開発、そして上市されている（図 3）。二重特異性抗体は異なる 2 つの標的に結合できるように設計された次世代抗体医薬品であり、従来の IgG 抗体と同様に Fc 領域を有する二重特異性抗体や二種類の抗原結合領域のみで構成される二重特異性 T 細胞誘導（bi-specific T-cell engager, BiTE）抗体などが挙げられる。年間売上が 40 億ドルを超える emicizumab は IgG 様の二重特異性抗体であり、活性化第 IX 因子 FIXa と第 X 因子 FX を結合させ、FX を活性化するという、反応血液凝固カスケードの補助因子である血液凝固因子 VIII を代替するはたらきにより血友病 A の出血傾向の抑制に使用される^{25,26}。BiTE 抗体である blinatumomab は B 細胞性腫瘍に発現する CD19 と T 細胞に発現する CD3 と結合することで直接的に T 細胞を活性化し、がん細胞にアポトーシスを誘導する²⁷。BiTE 抗体は短鎖可変領域フラグメント（single-chain variable fragment, scFv）であり、Fc 領域を持たないため、血中半減期が短く、ADCC 活性などの機能は有さない²⁸。また、Fab 領域のみで構成される抗体医薬品である abciximab は血小板表面に存在する糖タンパク質 GPIIb/IIIa 受容体に結合し、血小板の凝集を防ぎ、冠動脈疾患等治療中の血栓の形成を防ぐはたらきがある²⁹。Abciximab などの Fab 抗体は Fc 領域が存在しないため、不要な免疫活性化を避けられ、また、分子量が小さいため組織拡散が早いのが特徴である。さらに、近年非常に注目されている抗体薬物複合体（antibody-drug conjugate, ADC）は抗体にリンカーを介してペイロードと呼ばれる抗がん剤となる低分子化合物を結合しているため、抗体の標的指向性と低分子化合物の高い細胞毒性により低い副作用と高い治療効果が期待される抗体医薬品である。ADC の使用目的となる主な疾患はがんであるため、ADC には ADCC 等を誘導できる IgG₁ が頻繁に用いられている³⁰。2022 年に 20 億ドルを超える売上高を記録した ADC である trastuzumab emtansine はがん細胞表面の HER2 に結合し、細胞内へ侵入すると、抗がん剤である emtansine が放出され、アポトーシスを誘導する^{31,32}。二重特異性抗体や ADC など、抗体をベースとした次世代抗体医薬品は他にも数多く開発、承認されており、今後も抗体医薬品全体の市場はより一層拡大すると予測される。

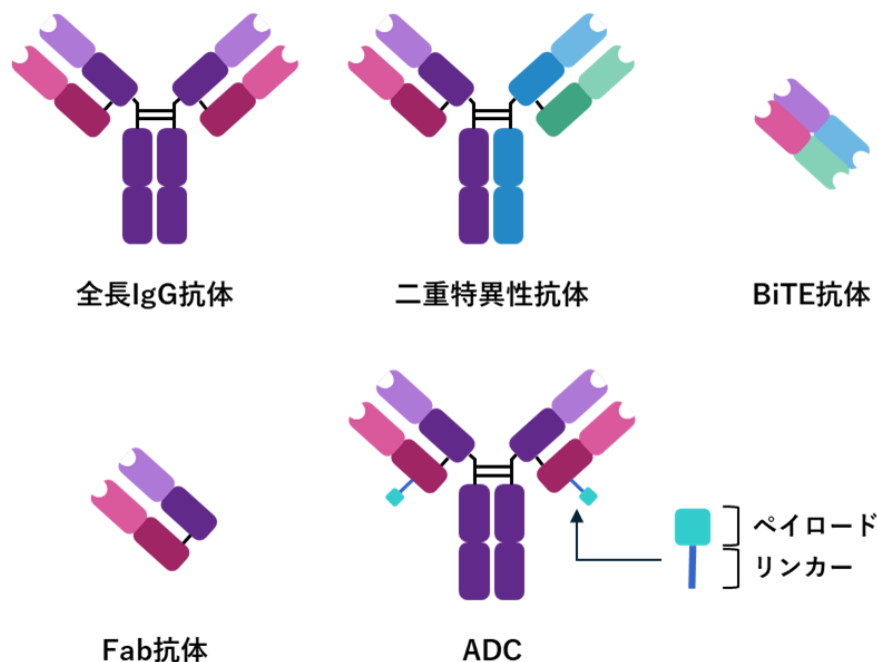


図3 高度にエンジニアリングされた抗体医薬品の模式図

1.2 抗体医薬品の生産宿主細胞

1.2.1 チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いた抗体医薬品生産

先述の通り、抗体医薬品の多くは複数のポリペプチド鎖からなる構造が複雑なタンパク質であり、ADCC等の医薬品としての機能の観点から *N*-結合型糖鎖といった修飾も必要であるため、哺乳類動物細胞が主な生産宿主細胞として用いられている。初めてFDAに承認された抗体医薬品、muromonab-CD3はマウスハイブリドーマを用いて生産されたが、マウス抗体は免疫原性等の観点で課題があり、その後は分子生物学技術と哺乳類細胞の遺伝子操作技術の進歩により組換え細胞株を生産宿主としたキメラ抗体やヒト化抗体等が抗体医薬品の中心となった^{33,34}。現在、抗体医薬品の主要な生産宿主であるチャイニーズハムスター（*Cricetulus griseus*）卵巣（Chinese hamster ovary, CHO）細胞を用いて初めて生産されたバイオ医薬品、組換え組織型プラスミノゲン活性化因子（recombinant tissue-type plasminogen activator: rt-PA）がFDAに承認されたのは1986年である³⁴。その後、1997年に最初のCHO細胞を用いて生産されるキメラ抗体である抗体医薬品、RituximabがFDAに認可された。その製造にはrt-PAの製造に使用されていた12,000 Lのバイオリアクターが使用され、当時の抗体生産において前例のない大規模生産であった³³。それ以降、流加培養に関する発展やchemically defined medium（CDM）の開発も伴って、大規模培養における実績の蓄積が加速し、2022年時点で、89%のモノクローナル抗体医薬品がCHO細胞を用いて製造されている³⁵。

CHO細胞は1957年にthe University of ColoradoでTheodore T. Puck氏らによっ

てメスのチャイニーズハムスターの卵巣から単離されて以降³⁶、数多くの適応や改変が行われ、CHO-K1, CHO-S, CHO-DG44, CHO-DXB11 細胞などを始めとする、様々な CHO 細胞株が開発されてきた^{37,38}。CHO 細胞が抗体医薬品生産にこれほど頻繁に使用されている理由は先述の大規模培養における実績の多さにも関わるが、無血清培地で容易に培養でき、人同等の糖鎖修飾が行え、遺伝子改変が容易であるためである^{39,40}。CHO 細胞の遺伝子改変の容易さにより dihydrofolate reductase (DHFR)が完全に、または一部欠損した CHO-DG44 や CHO-DXB11 細胞、glutamine synthetase (GS)欠損株である CHO-GS 細胞などの遺伝子増幅システムの開発が可能となり、抗体医薬品の収量向上に大きく寄与している^{41,42}。加えて、CDM の改良や個々の生産株への最適化^{43,44}、さらには高細胞濃度培養技術の開発^{45,46}も相まって、10 g L⁻¹を超える高収量も報告されている⁴⁷。

1.2.2 抗体生産株構築

CHO細胞を用いた抗体生産において高生産を達成するために細胞あたりの抗体生産能、つまり 1 細胞が単位時間あたりに生産する抗体量である比生産速度を増加させるような抗体生産株構築手法や細胞改変手法が数多く検討されている。先述の遺伝子増幅はゲノムに導入した目的生産物の遺伝子のコピー数が増加することで mRNA への転写量が増加するシステムであるが、目的遺伝子の発現量増加には最適化されたベクターや活発に転写されるゲノム上のホットスポットへのターゲットインテグレーションも用いられている。ヒトサイトメガロウイルス (human cytomegalovirus, CMV) プロモーターは導入遺伝子の発現量が非常に高く、シミアンウイルス 40 (simian virus 40, SV40) プロモーターは目的遺伝子の発現量を長期間維持できることが報告されている⁴⁸。Fer1L4 や Rosa26 などのゲノム上の転写のホットスポットはオミクス解析なども組み合わせた大規模スクリーニングによって特定されている^{49,50}。ホットスポットへの組み込みには宿主細胞へのランディングパッドと呼ばれるターゲットインテグレーションの際に発現カセット交換を効率よく媒介するシステムが用いられている。ランディングパッドには選択マーカーとリコンビナーゼやインテグラーゼの認識部位が含まれており、Fer1L4 や Rosa26 へのターゲットインテグレーションには BxB1 リコンビナーゼが採用されている^{49,50}。また、トランスポザーゼを用いたセミターゲットインテグレーションは比較的簡便に短期間で高発現株を取得できる方法として近年注目されており、Sleeping Beauty や PiggyBac などのトランスポザーゼが CHO 細胞を用いた抗体生産に使用されている⁵¹。翻訳に関しても多くの研究がなされており、導入遺伝子の塩基配列を CHO 細胞が好んで利用するコドンへ最適化することで、抗体生産量が増加する報告がされている⁵²。また、組換えタンパク質の発現や培養環境の変化に起因する小胞体ストレスにより CHO 細胞は小胞体ストレス応答 (unfolded protein response, UPR) を引き起こし、それは翻訳の減衰に繋がるが、ATF4 などの UPR 関連遺伝子の過剰発現は翻訳の減衰を抑制し、抗体生産量を増加させることが報告されている⁵³。CHO 細胞の転写や翻訳に関する技術に加え、抗体等の複雑なタンパク質を生産す

る上で、翻訳後のプロセス、すなわち分泌に関する制御も非常に重要であり、様々な試みが実施されているが、こちらに関しては 1.3 にて記述する。

1.2.3 新規樹立チャイニーズハムスター肺 (CHL-YN) 細胞

これまで記述した通り、数多くの研究により抗体医薬品生産において圧倒的な地位を築いている CHO 細胞であるが、人工的な細胞改変には制限もある。例えば、CHO 細胞の増殖速度は約 20 時間であり、哺乳類動物細胞としては平均的な増殖速度ではあるものの、CHO 細胞を用いた研究や開発、製造に長い期間を要する一つの要因となっている。複雑な細胞内での事象が重なり合った結果としての増殖速度は大幅な短縮が非常に難しいと考えられる。近年、高増殖能を有する新規の宿主細胞として、チャイニーズハムスター卵巣由来の CHO-MK 細胞⁵⁴やチャイニーズハムスター肺由来の CHL-YN 細胞⁵⁵が樹立された。チャイニーズハムスターの肺組織から得られた初代培養細胞は fetal bovine serum (FBS)を含む Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM)で培養され、91 日かけて血清濃度を順次下げ、無血清 CDM に馴化した。CHL-YN 細胞は CHO 細胞で一般的に用いられる CDM で 8.1 h の倍加時間を記録し、倍加に約 20 時間要する CHO 細胞の増殖速度による制限を補完する可能性をもつ抗体生産宿主として期待されている。また、フラスコ回分培養における対数増殖期の比増殖速度は CHL-YN 細胞と CHO-K1 細胞でそれぞれ 0.0645 h^{-1} と 0.0326 h^{-1} であった。モノクローナル抗体の生産能力としては同じ条件で培養された IgG₁ 生産 CHO-K1 細胞が生産する抗体量の 50% から 100% 以上を CHL-YN 細胞がより短期間で生産することが報告されている。IgG₁ の N-結合型糖鎖修飾に関しても、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)を用いた糖鎖解析において CHO-K1 細胞によって生産された IgG₁ の N-結合型糖鎖修飾と同様のピークを CHL-YN 細胞の生産物も示した。安全性もマイコプラズマ検出試験により最小限のレベルでは調査されており、抗体生産宿主として適応可能であることが確認されている。従って、CHL-YN 細胞は従来の CHO 細胞がもつ生産宿主としての必要な特徴と類似した特徴を持ちながらも、増殖速度が 2 倍以上速く、抗体医薬品の研究開発や製造期間を短縮することができる可能性を持つ。CHL-YN 細胞は他にも抗体生産に関わるユニークな特徴を示しており、先行研究では、CHL-YN 細胞の GS の発現が CHO-K1 細胞の 6 倍以上であることが確認されており、フラスコ回分培養やバイオリクターでの流加培養において培養開始から 2-4 日の間に一度枯渇した培地中のグルタミン濃度が上昇し、4-6 mM 程度に達することが報告されている。また、流加培養中の細胞内代謝経路の解析によると、アルギニンとメチオニン代謝経路の中間体濃度の経時変化が CHO-K1 細胞と CHL-YN 細胞で大きく異なっていることが明らかとなっている⁵⁶。しかしながら、抗体生産宿主としての CHL-YN 細胞への理解は限定的であり、長年に渡り蓄積された CHO 細胞に関する知見に基づき CHL-YN 細胞への理解を加速させる必要がある。

1.3. 抗体分泌プロセス

1.3.1 抗体生産 CHO 細胞の分泌プロセス

抗体の生産に CHO 細胞などの哺乳類動物細胞が用いられている理由にも列挙されるように、抗体は翻訳後、分泌プロセスにおいて高度で複雑な修飾や処理を受け、細胞外へ分泌される必要がある (図 4)。小胞体内へ輸送された HC や LC のポリペプチドは BiP や PPIase などのシャペロン分子の支援によって小胞体内で折りたたまれる。適切に折りたたまれた HC はホモダイマーを形成し、そこへ同じく折りたたまれた LC がアセンブリし、HC 2 本と LC 1 本のヘテロトリマーなり、そして、HC 2 本と LC 2 本からなる抗体分子へとアセンブリされる⁵⁷⁻⁵⁹。抗体分子内の HC と LC はそれぞれが PDI によって形成されるジスルフィド結合によって連結される⁶⁰。アセンブリが完了した抗体は非特異的にまたは ERGIC-53 などのレクチンタンパク質により選択的に、Sar1A の駆動により形成される COPII 小胞に組み込まれ、ゴルジ体へと輸送される⁶¹⁻⁶³。小胞体で正しく折りたたまれなかったタンパク質は小胞体関連分解 (ER-associated degradation, ERAD) 経路を通じて分解される⁶⁴。正しく折りたたまれていないタンパク質が蓄積すると UPR が誘導され、PERK と IRE1、ATF 6 をそれぞれセンサータンパク質とする 3 つのシグナル伝達経路が活性化され、シャペロンタンパク質の発現量増加や ERAD 経路の活性化をはじめとする様々な方法を介して、小胞体ストレスの軽減を行う⁶⁵。ゴルジ体では抗体医薬品の品質として重量な *N*-結合型糖鎖修飾の成熟が行われ、ADCC 活性や CDC 活性にも関わるガラクトースやフコースが付加される。

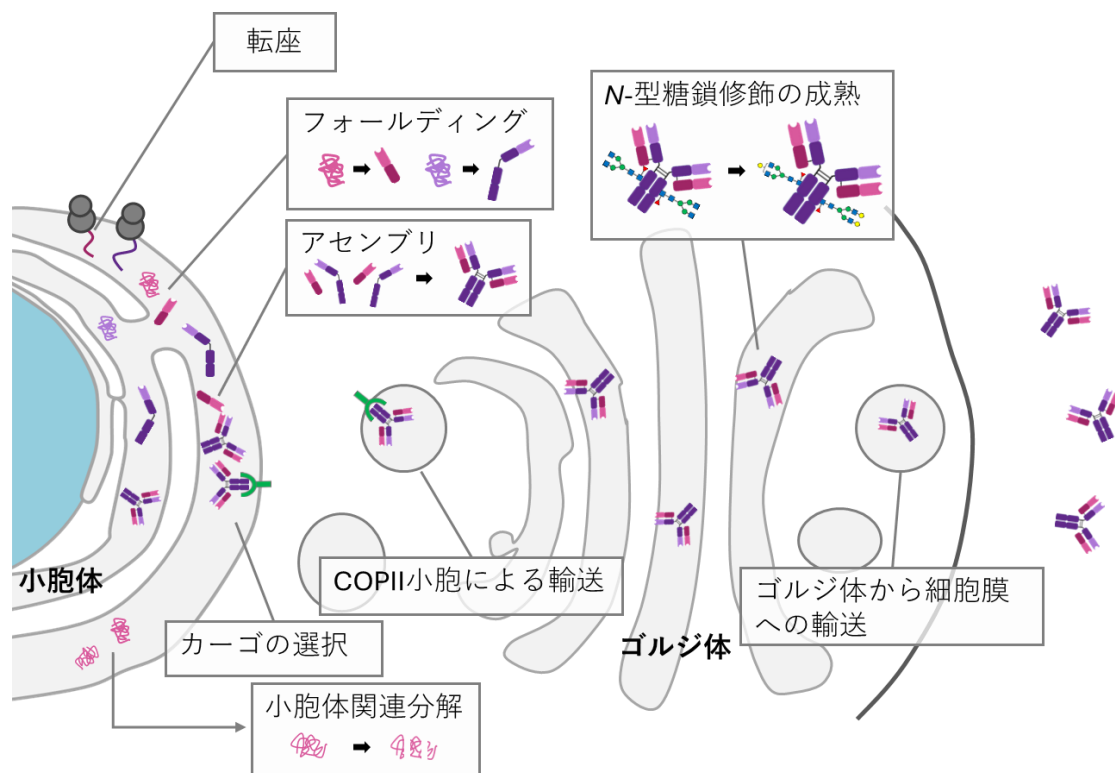


図4 抗体生産 CHO 細胞の分泌プロセス

1.3.2 分泌プロセスに関するセルエンジニアリング

CHO 細胞の分泌プロセスの強化を目的としたこれまでの研究では、生体内で分泌に特化した細胞を模倣するアプローチや分泌プロセスにおけるボトルネックを特定し、セルエンジニアリングによりそのプロセスを特異的に強化するアプローチが研究されている⁶⁶。例えば、自然界で分泌を担い、1 細胞あたり 200-400 pg の抗体を一日で生産する形質細胞⁶⁷⁻⁶⁹を模倣するためにその表現型マーカーである *Blimp1* やその関連遺伝子を過剰発現することで抗体の比生産速度が増加することが報告されている^{70,71}。先行研究により、シグナルペプチドなどのポリペプチドの誤った処理⁷²、不適切なフォールディングやアセンブリ⁷³、タンパク質の凝集⁷⁴や抗体の小胞体への蓄積⁷⁵などが細胞株または生産物に特異的な分泌プロセスにおけるボトルネックになりうることが指摘されている。セルエンジニアリングによりボトルネックが指摘されたプロセスを担うタンパク質を過剰発現することで一部の CHO 細胞の抗体生産性が改善されている^{72,76-78}。また、CHO を抗体生産細胞として最適化するために、抗体生産 CHO 細胞と形質細胞のオミクスプロファイルを比較解析した研究では、小胞体に関連するプロセッシングやタンパク質の糖鎖修飾、膜輸送に関する遺伝子オントロジー (gene ontology, GO) タームが形質細胞において有意にエンリッチされていた⁷⁹。CHO 細胞を形質細胞の表現型に近づけるために、エンリッチされていた GO タームに含まれる発現量に差のある遺伝子、いわゆる発現変動遺伝子 (differentially

expressed gene, DEG)を CHO 細胞で過剰発現し、シャペロンや UPR 関連遺伝子の過剰発現が抗体の比生産速度を増加させることが確認されている⁷⁹。

1.3.3. 分泌プロセスに関する課題

先述の通り、CHO 細胞の分泌プロセスに関して様々なボトルネックが報告されており、従来型のモノクローナル抗体に加え、近年増加している二重特異性抗体を始めとする、高度に改変された抗体の生産は分泌プロセスへのより大きな負荷を生ずると考えられる。また、CHL-YN 細胞など、新規の宿主細胞の樹立も急速に進んでおり、異種の抗体や細胞株横断的な分泌プロセスに関する基盤的知見の収集を加速させる必要がある。

抗体生産 CHO 細胞の分泌プロセスに関するボトルネックのひとつとして、小胞体において抗体が蓄積しているという報告がなされており、これが複数種類の IgG₁ 生産 CHO 細胞に関して確認されている⁷⁵。これらの細胞では抗体の小胞体からゴルジ体への小胞輸送の強化が鍵を握ると考えられる。しかしながら、これまで抗体を選択的に輸送小胞 COPII へ組み込むレクチンタンパク質、ERGIC-53 などの過剰発現により抗体の比生産速度が改善した例はあるものの⁷⁸、COPII 小胞に関する細胞改変が IgG 抗体の輸送を強化し、小胞体における抗体の蓄積の解消やそれに伴う抗体の比生産速度の改善につながった例はほとんど報告されていない。従って、抗体の小胞輸送を強化することが可能な細胞改変方法の確立が課題である。

これまでに指摘されてきた分泌プロセスにおけるボトルネックは数多く存在するが、その多くは小胞体に関連する分泌プロセスに生じていると言える^{66,80}。小胞体ではフォーリングやアセンブリ、輸送タンパク質の選択や小胞輸送が主に行われるが、これらのプロセスにおけるボトルネックは生産する抗体の種類や細胞株によって様々であり、どのプロセスにボトルネックがあるのかを推定するには試行錯誤的な解析が必要である。その背景には小胞体に関わる分泌プロセスの各プロセスで生じたボトルネックが抗体の比生産速度や細胞内抗体や中間体の挙動に与える影響への理解が限定的である現状がある。分泌プロセスにおける種々のボトルネックと抗体生産の関係性を明らかにすることで、細胞株や生産物に特異的な分泌プロセスにおけるボトルネックの推定や、合理的なセルエンジニアリングが可能となることが期待される。

近年では従来の CHO 細胞以外の宿主細胞の開発も盛んにおこなわれており、CHL-YN 細胞のような高い増殖能を有する細胞株も開発されている。しかしながら、CHL-YN 細胞のような、増速の速い細胞株の抗体生産能に直結する分泌プロセス等に関する知見は非常に限定的であるため、数多くの抗体医薬品の製造に用いられてきた従来の CHO 細胞との比較により、抗体生産宿主細胞としての特徴を理解することが求められる。特に、CHL-YN 細胞と CHO 細胞間での網羅的な比較はこれまでほとんど実施されていないため、オミクス解析を実施することで抗体生産能を左右するプロセスの中で、上方制御または下方制御されているプロセスを明らかにすることが可能となる。これにより、高生

産 CHL-YN 細胞を取得するためのバイオマーカーの探索や高生産株を構築するために強化すべきプロセスの絞り込みが加速されると期待される。

既知または未知の分泌プロセスにおけるボトルネックに対する新たな改善手法の開発による個別のプロセスへのアプローチは、分泌プロセスの強化方法の選択肢を拡大し、抗体生産株が抱える様々な課題の解消に寄与する。また、分泌プロセスは転写や翻訳とは異なり、ボトルネックとなるプロセスが多種多様であるため、迅速にボトルネックを絞り込むスクリーニング手法の開発によるトップダウンアプローチは分泌プロセスの強化を加速させる。さらに、CHO 細胞をベースに長い年月をかけて培ってきた分泌プロセスへの知見を新規の宿主細胞へと応用していく水平方向へのアプローチは、従来の CHO 細胞では解決できなかったバイオ医薬品生産における課題を 1 日でも早く新規の宿主細胞の有用な特徴によって解決するために、実用可能な宿主細胞へと迅速に開発を進めていくことに貢献する。本研究は、個別のプロセスへのアプローチ、トップダウンアプローチ、水平方向へのアプローチとして、上記の 3 つの具体的な課題に対して実施された 3 つの研究によって構成されている。

1.4 本博士論文の構成

IgG₁ 抗体の生産は CHO 細胞などの哺乳類細胞を用いる理由にも列挙されるように、翻訳後の分泌プロセス、特に小胞体やゴルジ体において複雑なプロセスを要する。CHO 細胞の分泌プロセスに関して多種多様なボトルネックが報告されており、従来型のモノクローナル抗体に加え、近年増加している高度に改変された抗体の生産はより一層分泌プロセスへの負荷を生ずると考えられる。新規の宿主細胞の樹立も急速に進んでおり、異種の抗体や細胞株横断的な分泌プロセスに関する基盤的知見の収集が要求されている。本博士論文では、これまで報告されている小胞体への抗体の蓄積を改善する手法の開発、異種 IgG₁ 抗体の分泌プロセスにおけるボトルネックを推定する手法の開発、そして、従来の CHO 細胞の 2 倍の増殖速度を有する肺由来の新規宿主細胞、CHL-YN 細胞の分泌プロセスに着目した網羅的解析を実施した。

第二章では、先行研究でボトルネックと指摘された小胞体への抗体の蓄積を解消するため、小胞体からゴルジ体への抗体輸送を担う COPII 小胞の形成に関わるタンパク質、Sar1A を CHO 細胞で過剰発現させ、抗体生産や分泌プロセスへの影響を解析した。Sar1A の過剰発現は回分培養における抗体の比生産速度を増加させ、細胞内抗体の蓄積を減少させた。蛍光免疫染色法による細胞内抗体の局在解析では Sar1A の過剰発現によりゴルジ体への局在化が確認され、抗体の小胞輸送が促進されることが示唆された。

第三章では、小胞体に関連する分泌プロセスであるフォールディングとアセンブリ、輸送タンパク質の選択、小胞輸送の 4 つのプロセスに人工的にボトルネックを誘導した細胞株を用いて、各ボトルネックが抗体の比生産速度や細胞内抗体やその中間体の蓄積や分泌に与える影響を明らかにし、得られた知見に基づき、3 種類の IgG₁ 抗体生産株における

ボトルネックを推定した。4つのプロセスを担う 5 種類のタンパク質を発現の容易な Trastuzumab の生産株において RNA 干渉法によりロックダウン(KD)し、ボトルネックを人工的に誘導した 5 種類の KD 細胞を構築した。回分培養における抗体の比生産速度と KD ターゲット遺伝子の発現量の関係から、アセンブリにおけるボトルネックが特に比生産速度を減少させることが明らかとなった。小胞輸送阻害剤 Brefeldin A (BFA)や翻訳阻害剤 Cycloheximide (CHX)を用いて、ボトルネックが抗体や中間体の細胞内濃度の変化に与える影響を解析したところ、ボトルネックを誘導したプロセスによって特徴的な違いが確認された。Rituximab と Infliximab、Bevacizumab 生産株を用いて阻害剤添加実験を行い、KD 細胞を用いて得られた分泌プロファイルを基に、ボトルネックを推定し、各プロセスに関わる遺伝子の過剰発現によりその推定の妥当性を検証した。

第四章では、CHL-YN 細胞と CHO 細胞のオミクスプロファイルの比較により、分泌プロセスを始めとする抗体生産に関わるプロセスを解析した。CHO 細胞のトランスクリプトミクスでは小胞体でのプロセッシングに関わる経路が上方制御されており、プロテオミクスでは小胞体とゴルジ体間の小胞輸送など、小胞輸送に関連するプロセスが広く上方制御されていた。一方、CHL 細胞では、翻訳や細胞周期、TCA cycle に関するプロセスが上方制御されており、特にプロテオミクスでは翻訳関連プロセスが顕著に上方制御されていた。この結果は CHL-YN 細胞の高増殖能を裏付けるとともに、小胞輸送などの分泌プロセスへの改善の余地が大きく残されていることを示唆した。

第五章では第二章で行った試行錯誤的にボトルネックを解析し、改善する手法と第三章で行った簡易にボトルネックを絞り込むスクリーニング方法を組み合わせることの重要性を強調し、また、CHL-YN 細胞の分泌強化に必要な細胞改変を論じた。さらに、第三章で得られた知見に基づき、より定量的かつ汎用性の高いボトルネックの推定手法を確立させるためのモデル化に関して記述し、総括した。

第二章 Sar1A の過剰発現が CHO 細胞の抗体生産と分泌プロセスへ与える影響

2.1 序論

抗体生産 CHO 細胞の分泌プロセスを解析した先行研究において、翻訳阻害剤添加から 4 時間後でも小胞体に抗体が蓄積していることが蛍光免疫染色法によって確認された⁷⁵。その際の細胞内抗体をサイズ排除クロマトグラフィーで分離したところ、そのほとんどは重鎖や軽鎖等の中間体ではなくアセンブリが完了した状態の抗体であり、小胞体への抗体の蓄積が一部の抗体生産 CHO 細胞でボトルネックとなっていることが推定された。先行研究でボトルネックと指摘された小胞体への抗体の蓄積を解消するため、COPII 小胞による小胞体からゴルジ体への抗体輸送の促進を試みた。COPII 小胞の被覆層複合体は積荷タンパク質を輸送する小胞を作るために小胞体膜を高度に湾曲するタンパク質から成る 2 つの層、inner coat および outer coat によって構成される (図 5)⁸¹。内側の柔軟な inner coat は Sar1/ Sec23/ Sec24 複合体で構成され、外側の被覆層である outer coat は Sec13/ Sec31 複合体で構成される⁸²。COPII 小胞の形成はグアニンヌクレオチド交換因子である Sec12 が Sar1 に結合した GDP を GTP に置換し、GTP 結合型 Sar1 がその N 末端側に存在する α -helix を介して小胞体膜に結合することで開始される。動物細胞の Sar1 には Sar1A と Sar1B の 2 つのアイソフォームが存在し、Sar1A は大部分の分子の輸送に関わるが、Sar1B はリポタンパク質のような巨大な分子の輸送に特異的に関わりと示唆されている⁸³。Sar1A は 22 kDa の GTPase であり、COPII 小胞の形成には Sar1A の小胞体膜への結合のみならず、Sar1A に結合した GTP の加水分解による小胞体膜からの脱離が必要であるため⁸⁴、Sar1A は COPII 小胞形成の初期と後期のステップを制御していると考えられる。また、抗体の比生産速度の高い CHO 細胞と低い CHO 細胞間でトランスクリプトミクスとプロテオミクスを比較した先行研究により、高生産細胞において Sar1A の発現量が mRNA およびタンパク質レベルで高いということが報告されている⁸⁵。従って、Sar1A の発現量増加により COPII 小胞の形成が促進され、ゴルジ体への抗体の小胞輸送が強化されれば、小胞体における抗体の蓄積は解消され、抗体の比生産速度は改善されることが考えられる。

本章では、抗体生産 CHO 細胞において Sar1A を過剰発現し、抗体の比生産速度や抗体の細胞内、特に小胞体における蓄積への影響を評価し、これらの影響がどのようなメカニズムによって生じているのかを解析した。さらに、Sar1A の過剰発現による COPII 小胞を介した抗体輸送の促進が、抗体生産に用いられる宿主細胞にとって非常に重要な適応応答システムである UPR や治療用抗体の品質を左右する糖鎖修飾に及ぼす影響を解析した。この CHO 細胞における小胞体とゴルジ体間の抗体輸送に対する新しいアプローチはモノクローナル抗体のみならず、COPII 小胞による輸送を必要とする治療用タンパク質の生産に幅広く貢献する可能性がある。

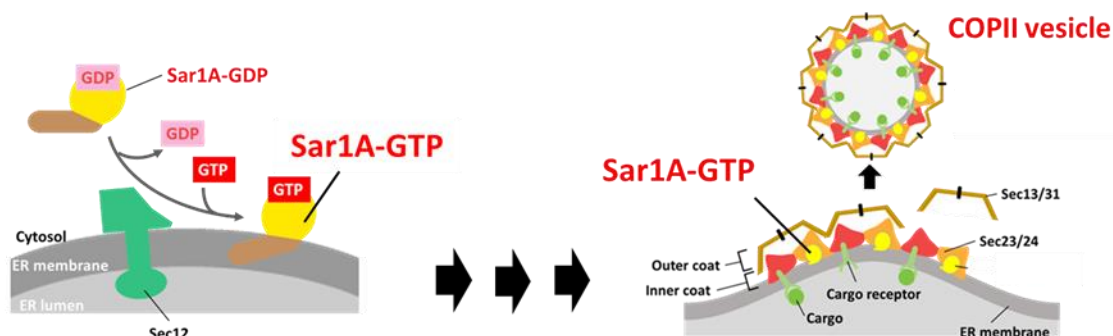


図 5 COPII 小胞形成の模式図

2.2 実験材料および実験方法

2.2.1 細胞培養

CHO-K1 細胞 (RRID: CVCL_0214) は 6 mM L-glutamine (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) を添加した BalanCD CHO Growth A (Irvine Scientific, Costa Mesa, CA) によって継代培養した。IgG₁ 生産 CHO-K1 細胞由来のクローン、CHO-HcD6 細胞株 (RRID: CVCL_9Y69)⁸⁶ は TOP2 (Irvine Scientific) と EX-CELL CD Hydrolysate Fusion (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) の無血清混合培地、mTOP2 に 6 mM L-glutamine と 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ puromycin (InvivoGen, San Diego, CA) を添加した培地で維持培養した。CHO-HcD6 とは異なる IgG₁ を生産する in-house の IgG₁ 生産 CHO-K1 細胞および in-house の IgG₃ 生産 CHO-K1 細胞は 6 mM L-glutamine と 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ puromycin を添加した BalanCD CHO Growth A によって継代培養した。CHO-HcD6 細胞と異なる IgG₁ を生産する IgG₁ 生産 CHO-K1 細胞および IgG₃ 生産 CHO-K1 細胞は本章では、CHO-IgG1B、そして、CHO-IgG3 細胞と表記する。継代培養は 125 mL Erlenmeyer shake flasks (Corning, Corning, NY) を用いて 20 mL の培養液量で、37°C、5% CO₂、湿度 80%、90 rpm で Climo-Shaker ISF1-XC (Kühner, Birsfelden, Switzerland) によって実施した。生細胞濃度 (viable cell concentration, VCC) および細胞生存率 (Viability) は Vi-CELL Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter, Brea, CA) で測定した。

2.2.2 Sar1A 過剰発現ベクターの構築

Sar1A 過剰発現ベクターは pBudCE4.1 vector (Invitrogen, Waltham, MA) を用いて構築した。Total RNA は CHO-K1 細胞から FastGene RNA Premium Kit (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) により抽出され、これを鋳型に PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて cDNA を合成した。Sar1A のコーディ

ングシーケンスを BamHI と HindIII の制限酵素認識配列を付与した 2 つのプライマー、forward primer, 5'-ATCAAGCTTACTGCTGGTCTGTGTGTTCTGAGGGA-3' と reverse primer, 5'-ATCGGATCCACCACTGGGCGATGAGCGTAGACAG-3' を用いて PCR 増幅し、pBudCE4.1 の CMV プロモーターの下流に挿入した。構築したベクター及び空ベクターは NheI (Takara Bio) によって線状化し、トランスフェクションに用いた。

2.2.3 Sar1A 過剰発現細胞の構築

CHO-HcD6 と CHO-IgGB1、CHO-IgG3 細胞は Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) によってトランスフェクションした。対数増殖期の細胞、 5×10^5 細胞は $1 \mu\text{g}$ の線状化した Sar1A 過剰発現ベクターまたはコントロール細胞構築用の空ベクターを用いてトランスフェクションし、12-well plates (Corning) に播種した。安定発現株は 6 mM L-glutamine と 3% [v/v] Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma Aldrich)、 $450 \mu\text{g mL}^{-1}$ Zeocin (Invivogen) を添加した BalanCD CHO Growth A にて選択した。セレクション後、20 mL の培養液量を含む 125 mL shake flask にまでスケールアップを行った。CHO-HcD6 と CHO-IgGB1、CHO-IgG3 細胞由来の Sar1A 過剰発現細胞およびコントロール細胞はそれぞれ CHO-HcD6-Sar1A と CHO-HcD6-Mock、CHO-IgG1B-Sar1A と CHO-IgG1B-Mock、CHO-IgG3-Sar1A と CHO-IgG3-Mock と名付けた。

2.2.4 回分培養

回分培養は 125 mL Erlenmeyer shake flasks を用いて 30 mL の培養液量で、 37°C 、5% CO_2 、湿度 80%、90 rpm で Climo-Shaker ISF1-XC によって実施した。使用した培地は CHO-HcD6-Sar1A と CHO-HcD6-Mock は 6 mM L-glutamine を添加した mTop2、CHO-IgG1B-Sar1A と CHO-IgG1B-Mock、CHO-IgG3-Sar1A と CHO-IgG3-Mock は 6 mM L-glutamine を添加した BalanCD CHO Growth A である。細胞播種濃度は $5 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ とした。ここでの回分培養並びに本研究のすべての実験における生物学的複製は特筆しない限り任意の回数の独立した培養によって取得した。

2.2.5 mRNA 発現の定量

mRNA を定量するために、total mRNA を 1.5×10^6 の細胞から FastGene RNA Premium Kit により抽出し、これを鋳型に PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit を用いて cDNA を合成した。mRNA の定量は各種プライマー (表 1) と Fast SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて、StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) により実施した。各遺伝子の mRNA の相対発現量はスタンダードカーブ法によって決定され、ハウスキーピング遺伝子である β -actin の発現量を用いて補正した。

CHO-HcD6-Sar1A と CHO-HcD6-Mock の回分培養では、培養開始 3 日後に回収

した細胞ペレットを用いて Sar1A および、HC、LC の mRNA 発現量を測定した。CHO-IgG1B-Sar1A と CHO-IgG1B-Mock の回分培養では、培養開始 3 日後、CHO-IgG3-Sar1A と CHO-IgG3-Mock の回分培養では、培養開始 2 日後に回収した細胞ペレットを用いて、Sar1A の mRNA 相対発現量を測定した。CHO-HcD6-Sar1A と CHO-HcD6-Mock を用いた UPR 解析では、回分培養開始から 1、4、6、7 日目の細胞ペレットを用いて 8 つの UPR 関連遺伝子、Xbp1、BiP、Gadd34、Chop、Herpud1、Sels、Sqstm1、Pcytl α の mRNA 相対発現量を測定した。

表 1 第二章の real-time PCR に使用されたプライマー

Target gene	qPCR forward primer (5' to3')	qPCR reverse primer (5' to3')
β -actin	ACTCCTACGTGGGTGACGAG	AGGTGTGGTGCCAGATCTC
Sar1A	GCGGATCATTCTCGTCTCATGGAAT	TTCAGTGCATCTGTCTGTCA
IgG1 heavy chain	CCCCGAGGTGAAGTTCAACTG	GCGGTACGTCGAGTTGTACTG
IgG1 light chain	GGAGGACTTCGCCACCTACT	ACGGTCCGCTTGATCTCCA
Xbp1	CTGAGTCCGAGCAGGTG	AGGGTCCAAGTGTCCAGAATG
BiP	TCGGTGGGTCTACTCGGATT	GACAGCAGCACCGTATGCTA
Gadd34	GGCAGAAACAGTAAGTGGAGC	GGTCCCTGGGCTGCTTTAC
Chop	ATCCCTAGCTTGGCTGACTG	GGCACTGACCACTCTGTTTC
Herpud1	GAGTCCCAACAGCGTCAC	GGGGTAGACTCGGCTCAAG
Sels	TCCAGAAACTGCAGTCCGA	TGCATTCTCAAACGAGCAGC
Sqstm1	CTGAGGCAGGCATTGAGGTTG	TGCTGCACTTGTCTTCTGTGTC
Pcytl α	GAGCGGCCTGTGAGAGTTTA	CCTTGAAGTTGTGCGTGAGC

2.2.6 抗体濃度の定量

回分培養中に培地へ分泌された抗体の濃度はサンドイッチ ELISA 法によって定量した。96-well plates (Corning) に $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ Goat anti-Human IgG-Fc Fragment Affinity Purified (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) を含む Coating Solution (SeraCare Life Sciences, Milford, MA) を $100 \mu\text{L well}^{-1}$ となるように添加し、 37°C で 1 時間インキュベートした。プレートからコーティングバッファーを除き、各ウェル $300 \mu\text{l}$ の 1% [v/v] bovine serum albumin (BSA)/phosphate-buffered saline (PBS) により 37°C で 30 分インキュベートし、ブロッキングを行った。ブロッキングバッファーの除去後、washing buffer (0.05% [v/v] Tween-20, 0.9% [v/v] NaCl in PBS) を用いて 3 回洗浄し、スタンダードと培養上清サンプルを添加し、 37°C で 1 時間インキュベートした。サンプルの除去後、washing buffer を用いて 3 回洗浄し、 $0.29 \mu\text{g mL}^{-1}$ Goat anti-Human IgG-Fc Fragment HRP Conjugated (Bethyl Laboratories) を含む 1% [v/v] BSA/PBS を $100 \mu\text{L well}^{-1}$ 添加し、 37°C で 30 分インキュベートした。二次抗体を含むバッファーの除去後、washing buffer

を用いて 3 回洗浄した。100 μl の peroxidase substrate solution (50% [v/v] KPL ABTS Peroxidase Substrate Solution A (SeraCare Life Sciences), 50% [v/v] KPL Peroxidase Substrate Solution B (SeraCare Life Sciences)) を添加し、2 分室温でインキュベートした後、100 μl の KPL ABTS® Peroxidase Stop Solution を添加し、反応を停止した。405 nm における吸光度を EnSpire 2300 Multilabel Reader (PerkinElmer, Waltham, MA) を用いて測定した。

2.2.7 比増殖速度および比生産速度の計算

比増殖速度は下記の式(1)、(2)に基づき、抗体の比生産速度は下記の式(3)、(4)に基づいて計算した^{87,88}。

$$\frac{dX_t}{dt} = \mu X_V \quad (1)$$

$$\ln X_t = \mu \int \left(\frac{X_V}{X_t} \right) dt + \ln X_0 \quad (2)$$

ここでは、培養時間 t (day)、全細胞濃度 X_t (cells L^{-1})、生細胞濃度を X_V (cells L^{-1})、比増殖速度 μ (day^{-1})、初期細胞濃度 X_0 (cells L^{-1}) である。

$$\frac{dP}{dt} = \rho X_V \quad (3)$$

$$P = \rho \int_0^t X_V dt + P_0 \quad (4)$$

ここでは、比生産速度 ρ ($\text{pg cell}^{-1} \text{day}^{-1}$)、培養時間 t (day)、生細胞濃度 X_V (cells L^{-1})、目的タンパク質濃度 P (pg L^{-1})、初期目的タンパク質濃度 P_0 (pg L^{-1}) である。

2.2.8 翻訳阻害剤 Cycloheximide (CHX) 添加アッセイ

CHO-HcD6-Sar1A と CHO-HcD6-Mock は 2×10^6 cells mL^{-1} で 125 mL Erlenmeyer shake flasks に添加した回分培養と同様の培地 20 mL に播種し、回分培養と同じ条件でインキュベートした。細胞播種の直後に CHX (Nacalai Tesque) を 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ となるように添加し、翻訳を停止した。その後、2 時間おきに培養液を 0.5 mL ずつサンプリングし、細胞ペレットを回収した。約 2×10^6 の細胞ペレットは 50 μl の 1% protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque) を含む、radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl (pH=7.5), 150 mM NaCl, 1% [v/v] sodium deoxycholic acid, 1% [v/v] TritonX-100) を用いて溶解した。SDS-PAGE に用いるタンパク質量を補正するために、ライセートのタンパク質濃度を Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。ライセートと還元剤を含まない 4×Laemmli buffer (250 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% [v/v] 2-mercaptoethanol, 8% [w/v] SDS, 20% [w/v] sucrose, and 0.02% [w/v] BPB) と混合し、Extra PAGE One Precast Gels 5%–10% (Nacalai Tesque) に 1 ウェルあたりの総タンパク質量が 2 μg となるようにサンプルをロードして SDS-PAGE

を行った。SDS-PAGEにより分離されたタンパク質は Immobilon-P Transfer Membranes (Merck Millipore, Burlington, MA)上にセミドライ法でブロットした。タンパク質をブロットしたメンブレンを 5% [v/v] skim milk/PBS with 0.1% [v/v] Tween 20 (PBST)により室温で1時間ブロッキングした。 β -actin の検出には一次抗体として、1% [v/v] skim milk/PBST で 1:10,000 に希釈した anti- β -Actin (8H10D10) Mouse mAb #3700 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) を添加し、4°C、オーバーナイトでインキュベートし、その後、PBST で3回洗浄した。二次抗体としては、Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (ab6789) (Abcam, Cambridge, UK)を 1% [v/v] skim milk/PBST で 1:10,000 に希釈して用い、4時間、室温でインキュベートした。抗体および HC や LC も含む中間体の検出には二次抗体をととして、Rabbit Anti-Human IgG H&L (HRP) (ab6759) (Abcam)を 1% [v/v] skim milk/PBST で 1:10,000 に希釈して用い、4時間、室温でインキュベートした。バンドの検出は Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore)を添加し、Luminograph I (ATTO, Tokyo, Japan)を用いて実施した。 β -actin および IgG やその中間体のバンド強度を CSAnalyzer 4 software (ATTO)を用いて定量し、IgG やその中間体のバンド強度はハウスキーピング遺伝子である β -actin のバンド強度によって補正した。

2.2.9 蛍光免疫染色法および画像解析

CHO-HcD6-Sar1A および CHO-HcD6-Mock は Poly-L-Lysine-coated German glass (Neuvitro Corporation, Camas, WA) をウェル底面に置いた 12-well plate に 8×10^4 cells mL^{-1} となるように播種し、6 mM L-glutamine と 3% [v/v] FBS を含む mTop2 で、培養液量 1 mL にて、37°C、5% CO₂、湿度 80%、静置インキュベーター(Panasonic, Osaka, Japan)にて接着培養した。細胞播種から 2 日後、細胞を PBS で洗浄し、4% [v/v] paraformaldehyde/PBS で 15 分間、室温でインキュベートし、Poly-L-Lysine-coated German glass 上に細胞を固定した。固定化を止めるため、4% [v/v] paraformaldehyde/PBS を除去し、100 mM glycine/PBS で 5 分間、室温でインキュベートした。PBS で 2 回洗浄後、0.1% [v/v] TritonX-100/PBS で 5 分間、室温でインキュベートし、透過処理を行った。PBS で 2 回洗浄後、5% [v/v] BSA/PBS で 1 時間、室温でインキュベートし、ブロッキングを行った。一次抗体は 5% [v/v] BSA/PBS で 1:1,000 に希釈した Rabbit polyclonal to SAR1 (ab125871) (Abcam)、ERGIC-53 (c-6) mouse monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX)、ゴルジ体マーカーとしての Purified Mouse Anti-GM130 (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ)、そして小胞体マーカーとしての Rabbit polyclonal to Calreticulin ab2907 (Abcam)を用いて、4°C、オーバーナイトでインキュベートした。PBS で 2 回洗浄後、二次抗体をととして、5% [v/v] BSA/PBS で 1:1,000 に希釈した Goat polyclonal to Rabbit IgG (Alexa Fluor 405) (ab175652)、Goat polyclonal to Mouse IgG (Alexa Fluor 647) (ab150115) (Abcam)、および Goat polyclonal to Human

IgG (Dylight 488) (ab96907) (Abcam)を用いて、1 時間、室温でインキュベートした。PBS で2 回、MilliQ water で1 回洗浄後、Poly-L-Lysine-coated German glass はスライドガラス上に Fluorescence Mounting Medium (Agilent Technology, Santa Clara, CA)を用いて固定された。蛍光顕微鏡 BZ-X710 (Keyence, Osaka, Japan)および DAPI、GFP、Cy5 filters (Keyence)を用いて、ターゲットタンパク質を検出し、蛍光染色画像を取得した。

ゴルジ体と IgG 間、および、Sar1A と ERGIC-53 間の共局在を半定量的に解析するために、ゴルジ体と IgG 由来の蛍光強度に起因するピクセル強度の両因子間の Pearson's correlation coefficients (PCC)⁸⁹と Sar1A と ERGIC-53 由来の蛍光強度に起因するピクセル強度の両因子間の PCC を単一細胞ごとに ImageJ (<https://imagej.net/ij/>)の open-source plug-in である Ezcolocalization を用いて決定した。Ezcolocalization では、解析に使用する各因子由来のピクセルの取得、取得したピクセルに基づく細胞該当領域 (region of interest) の決定、各 region of interest における PCC の計算の順に解析を実施したため、それらを順を追って説明する。まず、解析に使用する各因子由来のピクセルの取得では、バックグラウンドのノイズを除去し、各因子由来の蛍光強度を取得するため、複数のチャンネルが重なっている蛍光染色画像を各チャンネルにスプリットし、グレースケールの画像に変換した後、二値化した。各因子の二値化に使用した閾値は視覚情報に最も近いものをそれぞれ選択し、IgG、Sar1A、ERGIC-53 に対しては ImageJ のデフォルトの閾値を、ゴルジ体には RenyiEntropy⁹⁰を用いた。また、IgG の染色画像を RenyiEntropy で二値化し、得られたピクセルを region of interest の決定に使用した。次に、二値化により取得したピクセルに基づき、region of interest を決定した。任意の物理パラメータから細胞に該当する領域を決定する Cell Filters tab⁹¹を用い、RenyiEntropy で二値化された IgG のピクセルに基づき、面積が 1 以上の領域を細胞、すなわち region of interest と認識した。ここで、複数の細胞がひとつの細胞と認識された場合は region-of-interest manager を用いて手動で解析から除外した。最後に、各細胞に該当する領域、region of interest における任意の 2 つの因子間の PCC を計算した。本解析は CHO-HcD6-Sar1A と CHO-HcD6-Mock 細胞それぞれ 50 細胞ずつに対して実施した。なお、各 region of interest の任意の 2 つの因子間の PCC は以下の式(5)にて計算した。

$$PCC = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (5)$$

ここでは、 x_i は region of interest 上の因子 X の i 番目のピクセル強度を表し、 $\bar{x}$ は二値化した際に閾値を超えた因子 X のピクセルの平均ピクセル強度を表す。同様に、 y_i は region of interest 上の因子 Y の i 番目のピクセル強度を表し、 $\bar{y}$ は二値化した際に閾値を超えた因子 Y のピクセルの平均ピクセル強度を表す。 n は region of interest 上のピクセル

ルの総数を表す。本研究では、因子 X と因子 Y はゴルジ体と IgG、または、Sar1A と ERGIC-53 に該当する。

単一細胞上の 2 つの因子間の PCC を求めることでゴルジ体と IgG 間ならびに、Sar1A と ERGIC-53 間の各単一細胞上における共局在の強さを半定量的に評価することができる。例えば、ゴルジ体と IgG 間の PCC が高い細胞はより多くの IgG がゴルジ体に存在し、PCC が低い細胞はより少ない IgG がゴルジ体に存在することを意味する。

各細胞のゴルジ体と小胞体の蛍光免疫染色画像上でのピクセル面積を相対比較するために、ゴルジ体または小胞体を蛍光染色した画像を用いて、ImageJ による画像解析によって、ゴルジ体または小胞体のピクセル面積を測定した。小胞体ピクセルの面積は Ezcolocalization を用いて、デフォルトの閾値により算出した。細胞に該当する領域の決定は上記と同様に、IgG の染色画像を用いた Cell identification によって RenyiEntropy による閾値を用いて実施した。ゴルジ体の染色画像をグレースケールに変換し、トップ 1% の強度のピクセルを取得する閾値設定によりゴルジ体の領域を決定し、region-of-interest manager を用いてゴルジ体に該当する領域のピクセル面積を算出した。本解析は CHO-HcD6-Sar1A と CHO-HcD6-Mock 細胞それぞれ 50 細胞ずつに対して実施した。

2.2.10 質量分析による糖鎖解析

CHO-HcD6-Sar1A および、CHO-HcD6-Mock 細胞の回分培養 4 日目の培養上清を回収し、培養上清中の IgG を HiTrap Protein A HP (Cytiva, Marlborough, MA)を用いて分離し、約 2 mg 取得した。500 mU mL⁻¹の PNGaseF (Takara Bio)を 3 μL 用いて糖鎖は約 2 mg の IgG から切り出し、2-aminopyridine によって標識した⁹²。未反応の 2-aminopyridine は phenol/chloroform 抽出により除去した。ラベリングされた糖鎖は LC-2000Plus series (JASCO Corporation, Tokyo, Japan)と COSMOSIL 5C18-AR-II (Nacalai Tesque) を用いて reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) によって画分した。溶出は流速 1.2 mL min⁻¹、30°C、50 分間の条件で、solvent B (20% [v/v] acetonitrile/0.02% [v/v] trifluoroacetic acid)の solvent A (0.02% [%] trifluoroacetic acid)に対する割合を線形で 0%から 30%まで増加させることで行い excitation と emission に対してそれぞれ 310 nm と 380 nm をモニタリングした。Glucose oligomer 2-18 を糖鎖のスタンダードとして使用した。画分された糖鎖は LC-MS/MS system (Agilent Technologies)および HTC Plus software (Bruker Daltonics, Billerica, MA)を用いて解析した⁹³。各種 N-結合型糖鎖は液体クロマトグラフィーのピークエリアの面積に基づいて計算した。

2.3 結果

2.3.1 Sar1A 過剰発現株の抗体生産の評価

IgG 生産に対する Sar1A 過剰発現の影響を検討するため、CHO-HcD6-Sar1A および CHO-HcD6-Mock を回分培養した。CHO-HcD6-Sar1A の VCC は培養全期間を通じて CHO-HcD6-Mock よりも低かった (図 6A)。また、CHO-HcD6-Sar1A の viability は培養 7 日目に急激に低下し、CHO-HcD6-Mock における 8 日目での低下よりも 1 日早かった (図 6B)。一方、CHO-HcD6-Sar1A では生細胞濃度が低いにもかかわらず、回分培養全期間において CHO-HcD6-Mock よりも高い抗体濃度を示し、最終的に培養 6 日目に 177 mg L^{-1} に達した (図 6C)。培養 3 日目のサンプルを用いて Sar1A および IgG の HC、LC の mRNA 発現量を解析したところ、Sar1A の発現量は CHO-HcD6-Sar1A で有意に高い一方、HC および LC の発現には両細胞間で有意差は認められなかった (図 6D)。比増殖速度は、CHO-HcD6-Mock で 0.841 day^{-1} 、CHO-HcD6-Sar1A で 0.785 day^{-1} であり、培養 0 から 4 日目の対数増殖期において一定であった (図 6E)。また、対数増殖期における CHO-HcD6-Sar1A の抗体の比生産速度は $5.40 \text{ pg cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であり、CHO-HcD6-Mock の $3.64 \text{ pg cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ と比較して 48.4% 高かった (図 6F)。

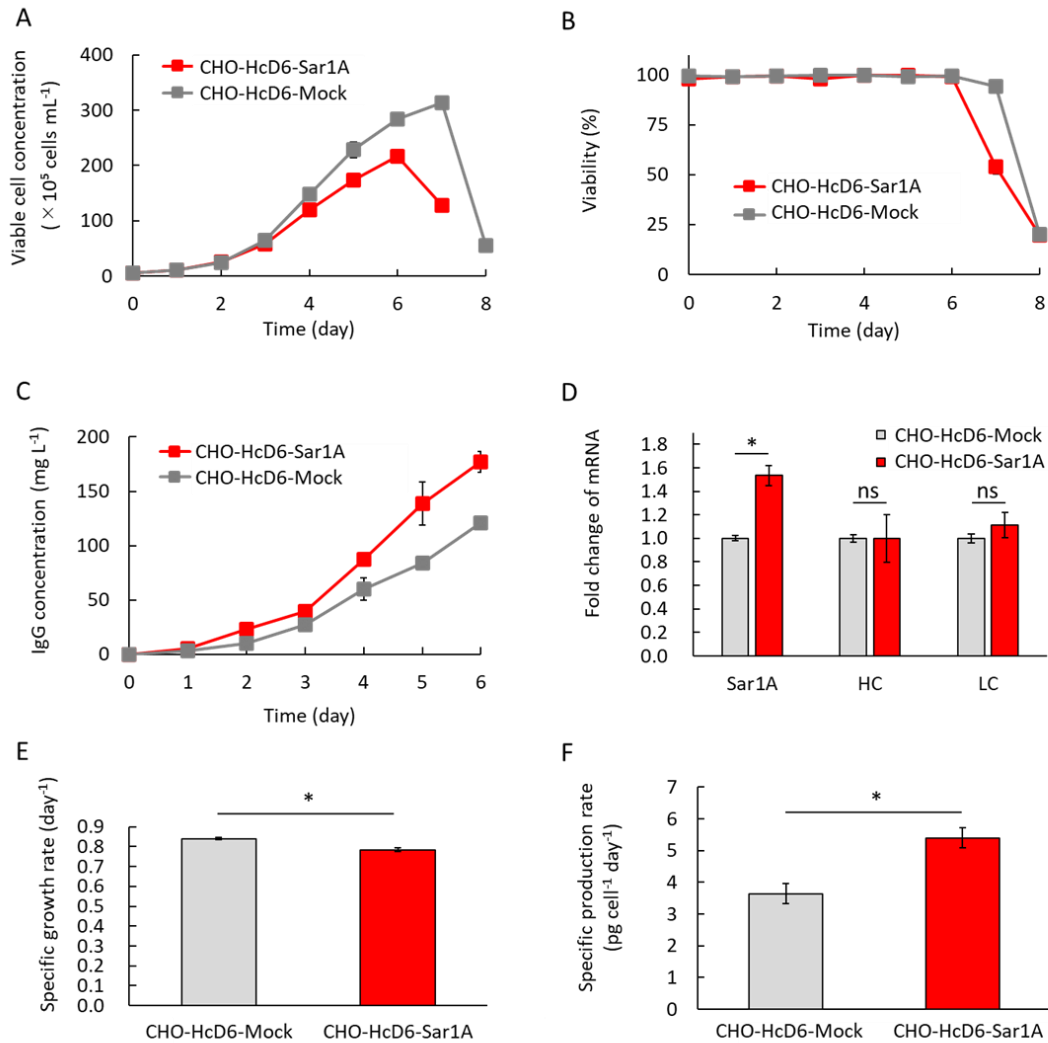


図6 回分培養における CHO-HcD6-Sar1A および CHO-HcD6-Mock の抗体生産の評価
(A) VCC、(B) Viability、(C) 抗体濃度、(D) 培養 3 日目における Sar1A および IgG の HC と LC の mRNA 発現量、(E) 対数増殖期における比増殖速度 (F) 対数増殖期における抗体の比生産速度。これらの図は Tsunoda, Y., *et al.* (2024). *J. Biosci. Bioeng.* **138**, 171-180.にて公開されている。

(* $p < 0.05$, ns, non-significant、エラーバーは $\pm$ SE を表す。(n=3))

2.3.2 Sar1A の過剰発現が CHO 細胞の抗体生産を強化したメカニズムの解析

翻訳阻害剤 CHX を用いて、細胞内抗体の減少を解析し、Sar1A 過剰発現が細胞内抗体の蓄積に与える影響を評価した。新生ペプチド合成を阻害するために CHX を培養液へ添加し、細胞外への分泌に伴う細胞内抗体の定量的変化を解析した。CHX 添加後 2 時

間ごとに採取したサンプルを SDS-PAGE およびウェスタンブロットにより解析した結果、約 150 kDa の分子量を有する IgG に対応するバンドが 140–180 kDa 付近に検出された (図 7A)。この付近に 2 本のバンドが観察されたのは、IgG を構成する HC または LC が部分的に正しく折りたたまれていないことに起因すると考えられる⁹⁴。さらに、140 kDa 以下の位置には抗体の中間体 (HC₂LC, HC₂, HCLC, HC, LC) に対応するバンドが検出された。IgG およびその中間体を示す各バンドの強度は、 β -actin のバンド強度で補正し、細胞内抗体量の変化を定量した。CHO-HcD6-Mock の 0 時間を基準とした相対値を算出し、プロットした (図 7B, C)。CHO-HcD6-Sar1A および CHO-HcD6-Mock の細胞内抗体量は時間経過とともに減少し、CHX の添加から 6 時間後に最小値へ到達し、それぞれ 0.112 および 0.218 となった (図 7B)。CHO-HcD6-Sar1A の初期抗体量は 0.434 であり、IgG の蓄積が限定的であることが示された (図 7B)。一方、細胞内抗体の中間体の初期量は CHO-HcD6-Sar1A において CHO-HcD6-Mock の 2.63 倍であった (図 7C)。両細胞における IgG の中間体は時間とともに減少し、CHX 添加から 8 時間後に最小値へ到達し、CHO-HcD6-Sar1A で 0.320、CHO-HcD6-Mock で 0.218 に達した。

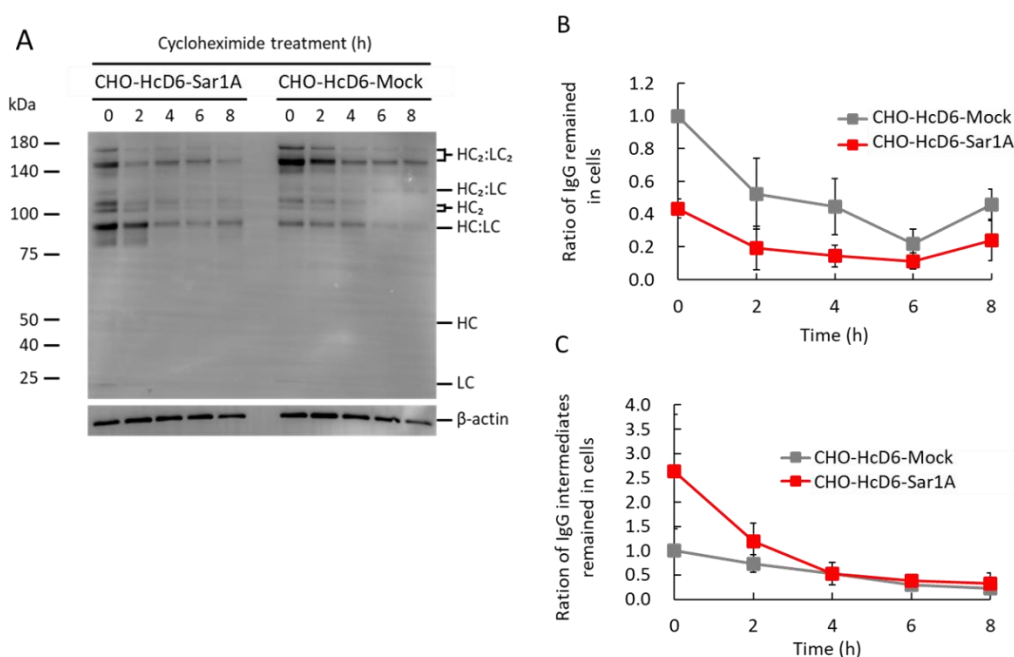


図 7 翻訳阻害剤 CHX 添加アッセイ

(A) 細胞内抗体 (HC₂LC₂) およびその中間体 (HC₂LC、HC₂、HCLC、HC、LC) のウェスタンブロット、(B) ウェスタンブロットのバンド強度から算出した細胞内抗体 (HC₂LC₂) 量の経時変化 (C) ウェスタンブロットのバンド強度から算出した細胞内抗体の中間体量の経時変化。これらの図は Tsunoda, Y., *et al.* (2024). *J. Biosci. Bioeng.* **138**, 171-180.にて公開されている。

(エラーバーは $\pm$ SEを表す。(n=3))

Sar1A の過剰発現が IgG の比生産速度を増加させ、細胞内抗体の蓄積を減少させたメカニズムを解明するため、蛍光免疫染色画像に基づく画像解析を用いて、ゴルジ体と IgG 間、ならびに Sar1A と ERGIC-53 間の共局在性を定量的に解析した。蛍光免疫染色によりゴルジ体および IgG（中間体を含む）は良好に染色された（図 8A）。図 8A では、左の図がゴルジ体と IgG のマージ画像、右上および右下がそれぞれゴルジ体および IgG のグレースケール画像である。これらのグレースケール画像に基づき、CHO-HcD6-Sar1A および CHO-HcD6-Mock、各 50 細胞におけるゴルジ体由来ピクセルと IgG 由来ピクセル間の PCC を ImageJ の Ezcolocalization を用いて算出し、箱ひげ図に示した（図 8B）。図 8A に示した矢印は、それぞれ PCC が 0.284 および 0.586 を示す細胞を指しており、箱ひげ図中の“×”は各 PCC の平均値を示す。CHO-HcD6-Sar1A の PCC の中央値および平均値はいずれも CHO-HcD6-Mock より高く、その変動幅も CHO-HcD6-Mock に比べて小さかった（図 8B）。一方で、最大 PCC 値は両細胞間でほぼ同等であり、またごく少数の細胞では IgG とゴルジ体間に負の相関が認められた。同様の手法により、Sar1A および ERGIC-53 を標的とした蛍光免疫染色を行い、Sar1A と ERGIC-53 のグレースケール画像および両者の重ね合わせ画像を取得した（図 8C）。その後、両者の PCC を算出した（図 8D）。図 8C に示す矢印は、PCC が 0.903 を示した細胞を表している。CHO-HcD6-Sar1A では、CHO-HcD6-Mock と比較して、PCC の平均値および中央値がいずれも高く、変動も小さかった（図 8D）。CHO-HcD6-Sar1A とは対照的に、CHO-HcD6-Mock では Sar1A と ERGIC-53 との相関が極めて弱い、あるいは負の相関を示す細胞が認められた。

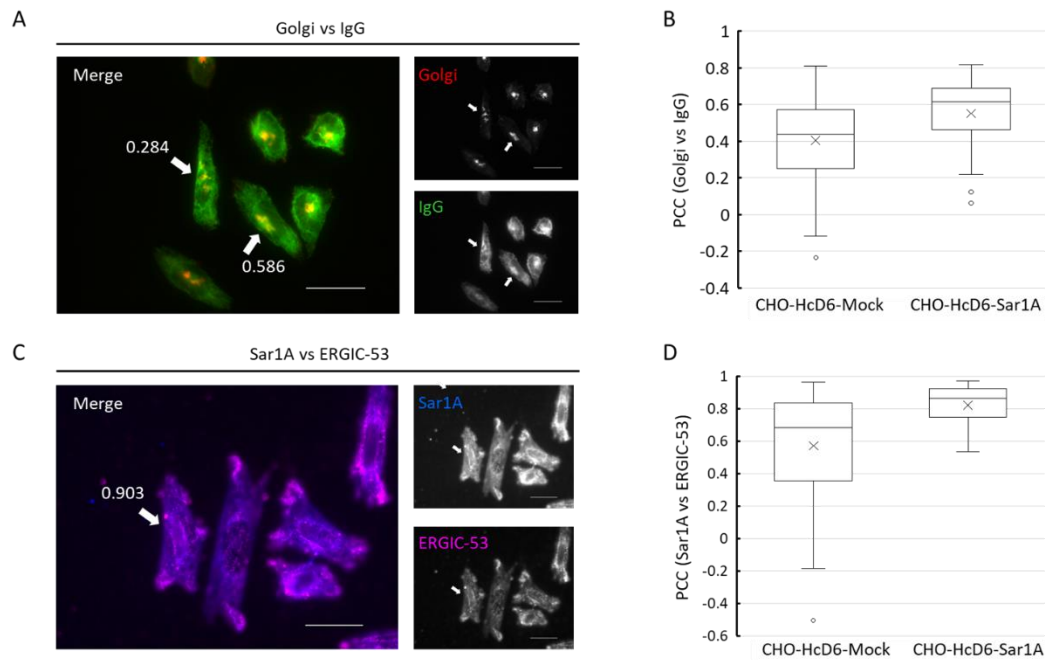
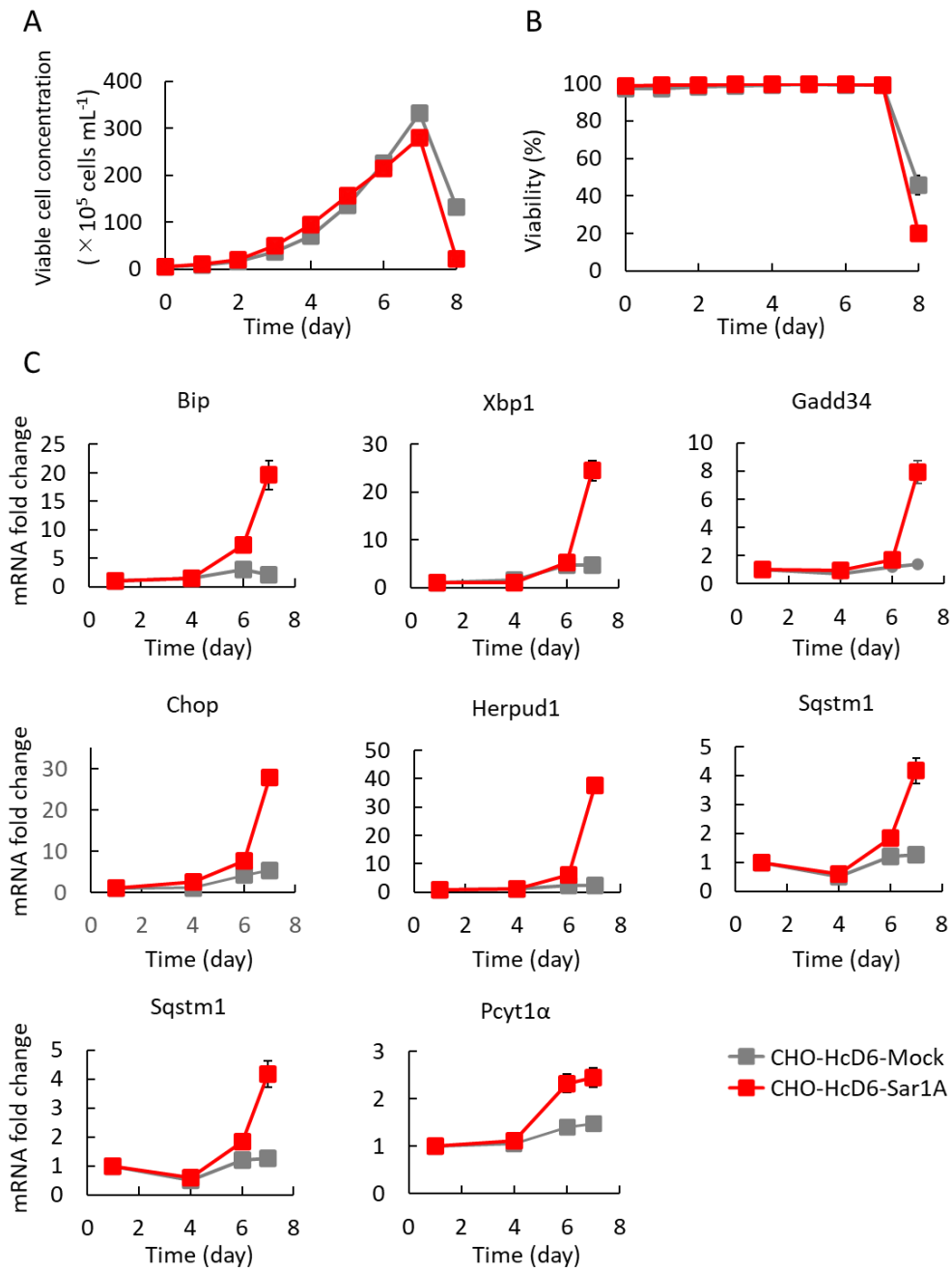


図 8 蛍光免疫染色画像を用いた共局在解析

(A) ゴルジ体（赤色）および IgG（緑色）を検出した蛍光免疫染色画像（bars: 25 μ m）、(B) 箱ひげ図を用いて表した 50 個の細胞におけるゴルジ体と IgG 間の PCC、(C) Sar1A（青色）および ERGIC-53（ピンク色）を検出した蛍光免疫染色画像（bars: 25 μ m）、(D) 箱ひげ図を用いて表した 50 個の細胞における Sar1A と ERGIC-53 間の PCC。これらの図は Tsunoda, Y., *et al.* (2024). *J. Biosci. Bioeng.* **138**, 171-180.にて公開されている。

Sar1A の過剰発現によって小胞体からゴルジ体への抗体輸送が促進された場合、小胞体における恒常性に変化が生じると考えられるため、回分培養における UPR をモニタリングし、さらに小胞体とゴルジ体の面積比を蛍光免疫染色画像を用いた画像解析によって評価した。CHO-HcD6-Sar1A および CHO-HcD6-Mock を用いた回分培養を行い、培養全体および対数増殖期に着目して UPR 関連遺伝子の mRNA 発現量を測定した。両細胞株は同程度に増殖し、VCC はピークに達し（図 9A）、回分培養は 8 日目に終了した（図 9B）。8 日目のサンプルでは、いずれの細胞も qPCR 解析に十分な mRNA を含んでいなかったため、対数増殖期である 1 日目および 4 日目、対数増殖期以降の 6 日目および 7 日目のサンプルを mRNA の定量に用いた。興味深いことに、CHO-HcD6-Sar1A では 6 日目にわずかな発現誘導が認められ、7 日目に UPR 関連 mRNA の強い発現が全体として観察された。一方、CHO-HcD6-Mock では 6 日目に発現誘導がわずかに見られたものの、翌日の 7 日目に CHO-HcD6-Sar1A のような強い発現は確認されなかった（図 9C）。対数増殖期における UPR 関連遺伝子の mRNA 発現に着目すると、8 遺伝子のうち 5 遺伝子は一貫して CHO-HcD6-Mock で高発現を示したのに対し、残る 3 遺伝子については、1 日目と 4 日目で発現が高い細胞が異なっていた（図 9D）。蛍光免疫染色画像に基づくイメージング解析により、小胞体およびゴルジ体のピクセル面積を算出した（図 9E, F）。小胞体のピクセル面積は CHO-HcD6-Sar1A で CHO-HcD6-Mock より 9.5%低かったが、ゴルジ体のピクセル面積は CHO-HcD6-Sar1A で 18.9%高かった（図 9E, F）。外れ値を除外した箱ひげ図を用い小胞体とゴルジ体の面積比を比較すると、CHO-HcD6-Mock では平均値 22.3、中央値 15.4 であったのに対し、CHO-HcD6-Sar1A では平均値 26.9、中央値 19.4 であった（図 9G）。



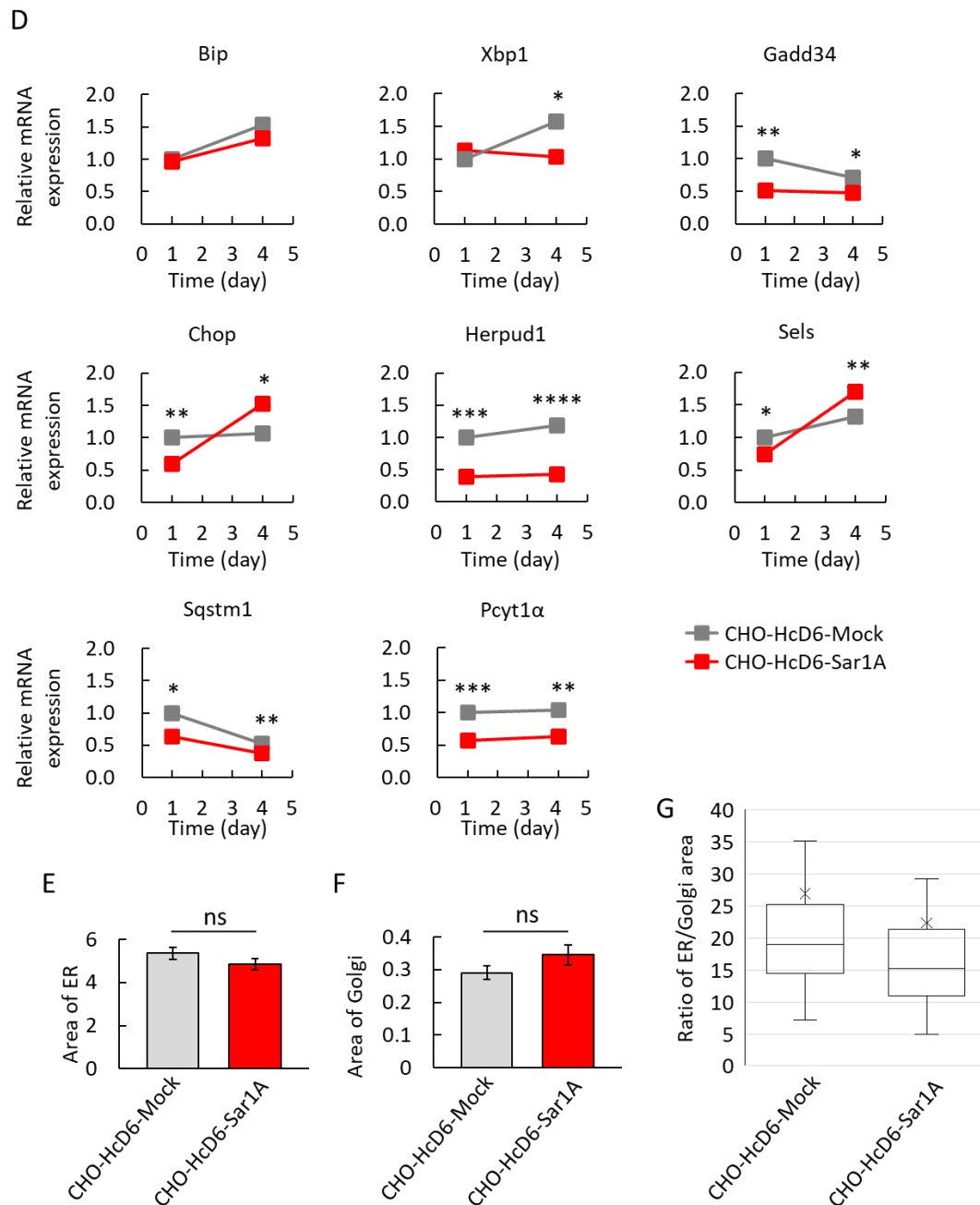


図9 UPR 解析

(A) VCC、(B) Viability、(C) 各細胞の1日目を1とした際の1、4、6、7日目における UPR 関連遺伝子の mRNA 発現量変化、(D) CHO-HcD6-Mock の1日目の発現量を1とした際の対数増殖期における UPR 関連遺伝子の発現量 (E) 画像解析による各細胞 50 細胞の小胞体のピクセル面積の平均 (F) 画像解析による各細胞 50 細胞のゴルジ体のピクセル面積の平均 (G) 小胞体とゴルジ体のピクセル面積比。これらの図は Tsunoda, Y., *et*

al. (2024). *J. Biosci. Bioeng.* **138**, 171-180.にて公開されている。

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. ns, non-significant、エラーバーは $\pm$ SE を表す。(n=3))

2.3.3 糖鎖解析

CHO-HcD6-Sar1A および CHO-HcD6-Mock から分泌された IgG の糖鎖構造を LC-MS/MS により解析し、CHO 細胞における Sar1A 過剰発現がモノクローナル抗体品質に及ぼす影響を評価した (図 10)。ここでは、両細胞株において G0、G0F、G1F および G2F 型の糖鎖構造が検出され、それぞれの存在比は CHO-HcD6-Mock で 1.3%、35.3%、52.6%、10.7%、CHO-HcD6-Sar1A で 1.4%、42.7%、47.6%、8.3%であった。いずれの細胞株においても、G0F および G1F 型が全体の約 90%を占め、両者の分布パターンは非常に類似していた。しかしながら、ガラクトシル化糖鎖である G1F および G2F 型の糖鎖の比率は、CHO-HcD6-Sar1A において CHO-HcD6-Mock よりも低かった。なお、CHO-HcD6-Mock および CHO-HcD6-Sar1A のいずれにおいてもハイマンノース型糖鎖構造は検出されなかった。

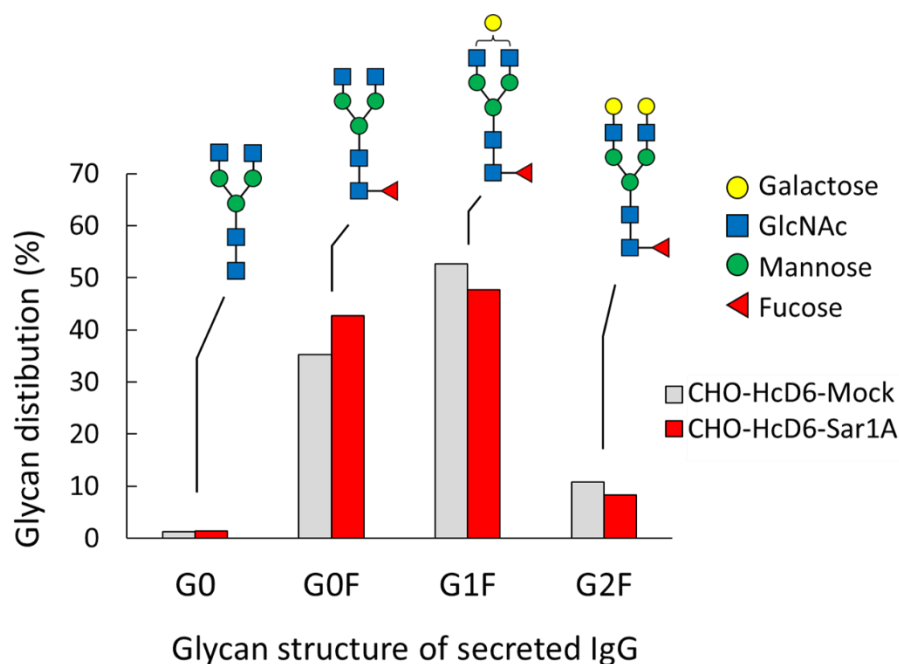


図 10 分泌された抗体の糖鎖解析

回分培養中に分泌された IgG の持つ糖鎖構造およびその割合。これらの図は Tsunoda, Y., et al. (2024). *J. Biosci. Bioeng.* **138**, 171-180.にて公開されている。

2.3.4 Sar1A の過剰発現の異なる抗体生産 CHO 細胞への応用

Sar1A 過剰発現が CHO-IgG1B および CHO-IgG3 細胞の回分培養における抗体の比生産速度に及ぼす影響を評価した。CHO-IgG1B-Sar1A および CHO-IgG1B-Mock の回分培養を 7 日間行った結果、両細胞株の増殖は非常に類似していた (図 11A, B)。IgG 濃度は培養 5 日目まで CHO-IgG1B-Sar1A において CHO-IgG1B-Mock より高値を示した (図 11C)。対数増殖期における CHO-IgG1B-Sar1A の IgG の比生産速度は、CHO-IgG1B-Mock と比較して 74.8%高かった (図 11D)。CHO-IgG3-Mock および CHO-IgG3-Sar1A についても回分培養を行った。両細胞株は培養 6 日目の終了時点まで類似した増殖を示した (図 11E, F)。対数増殖期における IgG 濃度は両細胞株間でほぼ同等であり (図 11G)、抗体の比生産速度は CHO-IgG3-Mock で $0.0489 \text{ pg cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 、CHO-IgG3-Sar1A で $0.0458 \text{ pg cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であり、有意な差は認められなかった (図 11H)。なお、CHO-IgG3 由来の両細胞株の抗体の比生産速度は、CHO-HcD6 および CHO-IgG1B 由来の細胞株と比較して著しく低かった (図 6F, 11D, H)。

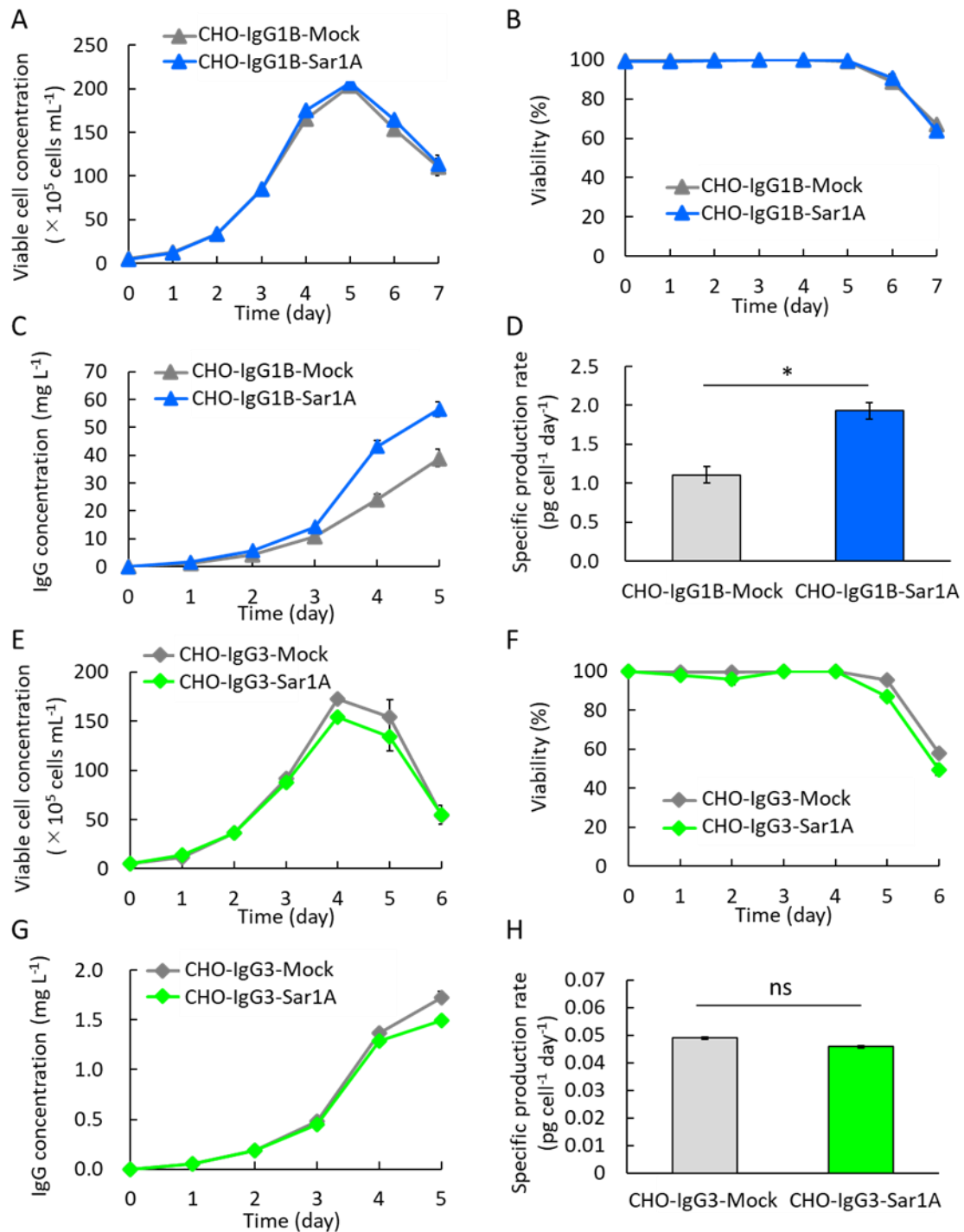


図 11 異なる抗体生産 CHO 細胞における Sar1A 過剰発現の影響

(A) CHO-IgG1B-Sar1A および CHO-IgG1B-Mock の VCC、(B) Viability、(C) 抗体濃度、(D) 対数増殖期における抗体の比生産速度、(E) CHO-IgG3-Mock および CHO-IgG3-Sar1A の VCC、(F) Viability、(G) 抗体濃度、(H) 対数増殖期における抗体の比生産速度。これらの図は Tsunoda, Y., et al. (2024). *J. Biosci. Bioeng.* **138**, 171-180.にて公

開されている。

(* $p < 0.05$, ns, non-significant、エラーバーは $\pm$ SEを表す。(n=3))

2.4 考察

本章では、抗体の小胞輸送の強化を目的とし、COPII 小胞形成に関与するタンパク質である Sar1A を IgG の小胞体への蓄積が確認されている IgG 生産 CHO 細胞において過剰発現させ⁷⁵、小胞体内における IgG の蓄積および、抗体の比生産速度への影響を解析した。また、Sar1A の過剰発現が、COPII 小胞を介した小胞体とゴルジ間の抗体輸送、IgG の N -結合型糖鎖修飾、さらには UPR に及ぼす影響を解析し、抗体の比生産速度が増加したメカニズムを明らかにするとともに、Sar1A と分泌プロセスとの包括的な関連性を解明することを目指した。

Sar1A 過剰発現が CHO 細胞の抗体の比生産速度を改善するのかを検証するため、CHO-HcD6-Sar1A およびそのコントロールである CHO-HcD6-Mock の回分培養を行った。CHO-HcD6-Sar1A は CHO-HcD6-Mock に比べ、ピーク VCC および対数増殖期における比増殖速度が低かった。しかしながら、IgG 濃度は CHO-HcD6-Sar1A において高い値を示し、その結果、対数増殖期における IgG の比生産速度は CHO-HcD6-Sar1A で有意に高かった。一方、IgG の HC および LC の mRNA 発現量には有意差が認められなかった。したがって、CHO 細胞内の組換えタンパク質生産プロセス全体において、抗体の比生産速度の改善は転写後、すなわち翻訳過程または翻訳後過程の改善に起因することが示唆された。

次に、真核細胞のリボソームに作用し、翻訳を阻害する CHX とウェスタンブロットを用いて、分泌に伴う細胞内 IgG 量の差異およびその時間変化を評価した。興味深いことに、CHX 添加時の細胞内抗体量は CHO-HcD6-Sar1A において CHO-HcD6-Mock の 43.4%であり、Sar1A 過剰発現によって細胞内での IgG の蓄積が抑制されることが示唆された。IgG の HC および LC の mRNA 発現量に有意差が認められなかったことから、細胞内 IgG の中間体量については両細胞株間で差異はないと予想されたが、予想に反して、CHX 添加後の細胞内 IgG の中間体量は CHO-HcD6-Sar1A で CHO-HcD6-Mock より高い値を示した。細胞内 IgG 量とその中間体量、さらには小胞体における抗体のアセンブリの間には複雑な関係が存在する可能性が考えられるが、この現象を説明するためにはさらなる実験が必要である。なお、CHX 添加 6 時間後には細胞内 IgG 量がプラトーに達し、その下限値は両細胞株間でほぼ同等であった。先行研究においては翻訳阻害後に IgG が細胞内に蓄積することが報告されているが⁷⁵、Sar1A の過剰発現は細胞内 IgG の完全な分泌をもたらすものではなかった。

Sar1A 過剰発現による抗体の比生産速度の向上および細胞内抗体の蓄積の減少の背景にあるメカニズムを解明するため、ゴルジ体と IgG、ならびに Sar1A と ERGIC-53 との共局在を定量的に解析した。しかし、異なる二種のタンパク質に結合する二種類のプローブが完全に重なって局在することは稀であるため、共局在を確認するには統計的指標が必要となる (24)。共局在解析には主に PCC や Manders' colocalization coefficient (MCC)⁹⁵ が用いられるが、MCC は co-occurrence の指標であり、PCC は相関の指標である⁹⁶。ここでは、CHO-HcD6-Sar1A と CHO-HcD6-Mock におけるゴルジ体と IgG、ならびに Sar1A と ERGIC-53 の共局在を定量的に比較するため、PCC を採用したが、これは、CHO-HcD6-Sar1A においてゴルジ体由来のシグナルが強い領域と IgG 由来のシグナルが強い領域が CHO-HcD6-Mock と比べてどの程度相関しているかを評価する必要があるためである。もし IgG が小胞体からゴルジ体へ多く輸送されれば、ゴルジ体における IgG 局在がより強くなると考えられる。実際、CHO-HcD6-Sar1A では PCC が高い値を示し、CHO-HcD6-Mock と比較して IgG がゴルジ体に強く局在していること、すなわち Sar1A 過剰発現により小胞体からゴルジ体への抗体輸送が促進され、細胞内 IgG の蓄積が減少していることが示唆された。ただし、IgG にはその中間体も含まれている可能性があることに留意する必要がある。さらに、Sar1A 過剰発現により COPII 形成が促進されているかを検証するため、Sar1A と ERGIC-53 の共局在解析を行った。ERGIC-53 はレクチンタンパク質であり、小胞体において IgG のような高マンノース型糖タンパク質に結合し、それらを COPII 小胞に積み込みゴルジ体へ輸送する役割を担っている^{97,98}。従って、Sar1A 過剰発現により COPII 小胞形成が加速されれば、Sar1A と ERGIC-53 の共局在が強まると予想される。実際、CHO-HcD6-Sar1A では CHO-HcD6-Mock に比べて Sar1A と ERGIC-53 の PCC が著しく高く、両者の共局在が強いことが示された。したがって、Sar1A 過剰発現は CHO 細胞において COPII 小胞形成を促進し、これにより小胞体からゴルジ体への IgG 輸送が促進され、細胞内 IgG の蓄積が低減し、最終的に IgG の比生産速度が向上した可能性が示唆された。

細胞培養において、CHO 細胞は培養環境の変動^{99,100}、組換えタンパク質発現、栄養枯渇¹⁰¹に起因する小胞体ストレスに曝される。この小胞体ストレスは正しく折り畳まれていないタンパク質の蓄積によって引き起こされ、これを緩和するために適応応答である UPR が誘導される。哺乳類細胞では、UPR の三つのシグナル経路が、タンパク質のフォールディング、ERAD、オートファジー、翻訳抑制による負のフィードバック、リン脂質合成、アポトーシスといった多様な細胞機構に関連する遺伝子の発現を誘導し、小胞体ストレスを解消するとともに細胞増殖を維持している^{102,103}。治療用抗体の生産において高品質かつ高生産を達成する得るためには、培養過程における UPR 経路全体の時間的变化¹⁰⁴および UPR 関連因子の発現レベルと組換えタンパク質生産との関連性¹⁰⁰を理解することが重要である。例えば、小胞体シャペロン BiP を用いたリアルタイムの小胞体ストレス

モニタリングシステムも構築されている¹⁰⁵。ここでは、Sar1A 過剰発現によって COPII 小胞を介した小胞体からゴルジ体への IgG 輸送が促進され、小胞体の恒常性が変化し小胞体ストレスが増大する可能性が考えられた。そこで、回分培養中における 8 種の UPR 関連遺伝子の mRNA 発現変化を解析した。これら 8 種の遺伝子は、タンパク質フォールディングに関わる BiP、負のフィードバックおよびアポトーシスに関与する Xp1s および Gadd34、アポトーシスに関与する CHOP、ERAD に関わる Herpud1 および Sels、オートファジーに関わる Sqstm1、リン脂質合成に関わる Pcyt1a から構成される。CHO-HcD6-Sar1A では、CHO-HcD6-Mock と比較して対数増殖期における 5 遺伝子の UPR 誘導が低かったが、8 日目に細胞死が始まる直前の 7 日目には全遺伝子において強い UPR 誘導が観察された。他の 3 遺伝子については、発現が高い細胞株が day 1 と day 4 で異なっていた。強い UPR 誘導が day 7 に認められた要因を検討するため、蛍光免疫染色および画像解析によって小胞体とゴルジ体の面積を比較したところ、CHO-HcD6-Sar1A では小胞体の面積が縮小し、ゴルジ体の面積は拡大していた。これにより、COPII 小胞を介した抗体輸送の促進が小胞体の膜成分の過剰輸送を伴い、小胞体の容量を減少させた結果、培養後期において UPR 誘導が強まったと推察された。

抗体の品質を維持することは、治療用途における抗体の機能を保証するために必須である³⁴。品質管理において評価すべき因子には、糖鎖修飾、凝集¹⁰⁶、チャージバリエーション¹⁰⁷などが含まれる。特に糖鎖修飾は薬物動態や薬力学に大きな影響を与えることが知られている^{108,109}。複雑な糖鎖修飾、例えばガラクトシル化はゴルジ体で行われる。しかし、Sar1A 過剰発現による小胞体からゴルジ体への抗体輸送の促進は、ゴルジ体における修飾処理への過負荷や、小胞体に存在する未成熟糖鎖の誤輸送を引き起こす可能性がある。そこで、CHO-HcD6 細胞において Sar1A 過剰発現が抗体の糖鎖修飾パターンを変化させるか、あるいは高マンノース型糖鎖の増加を引き起こすのかを調査した。その結果、予想に反して CHO-HcD6-Mock および CHO-HcD6-Sar1A のいずれにおいても高マンノース型糖鎖は検出されなかった。しかし、CHO-HcD6-Sar1A では CHO-HcD6-Mock と比較してガラクトシル化糖鎖の比率がわずかに低下していた。したがって、COPII 小胞を介した抗体輸送の促進は糖鎖修飾に対して軽微な影響を与えられと考えられる。

最後に、Sar1A 過剰発現の汎用性を評価するため、CHO-HcD6 細胞とは異なる IgG₁ 抗体および IgG₃ 抗体を生産する CHO 細胞においても比生産速度を改善するのか検証した。Sar1A は、先行研究により抗体分泌のボトルネックが小胞体に存在することが示唆されていた 2 種類の CHO 細胞において過剰発現した。その結果、CHO-HcD6-Sar1A は CHO-HcD6-Mock と比較して細胞増殖が劣っていたのに対し、CHO-IgG1B-Sar1A と CHO-IgG1B-Mock、ならびに CHO-IgG3-Sar1A と CHO-IgG3-Mock の間では細胞増殖の差は認められなかった。細胞増殖の抑制は、培養温度の低下¹¹⁰や細胞周期阻害剤の導入¹¹¹

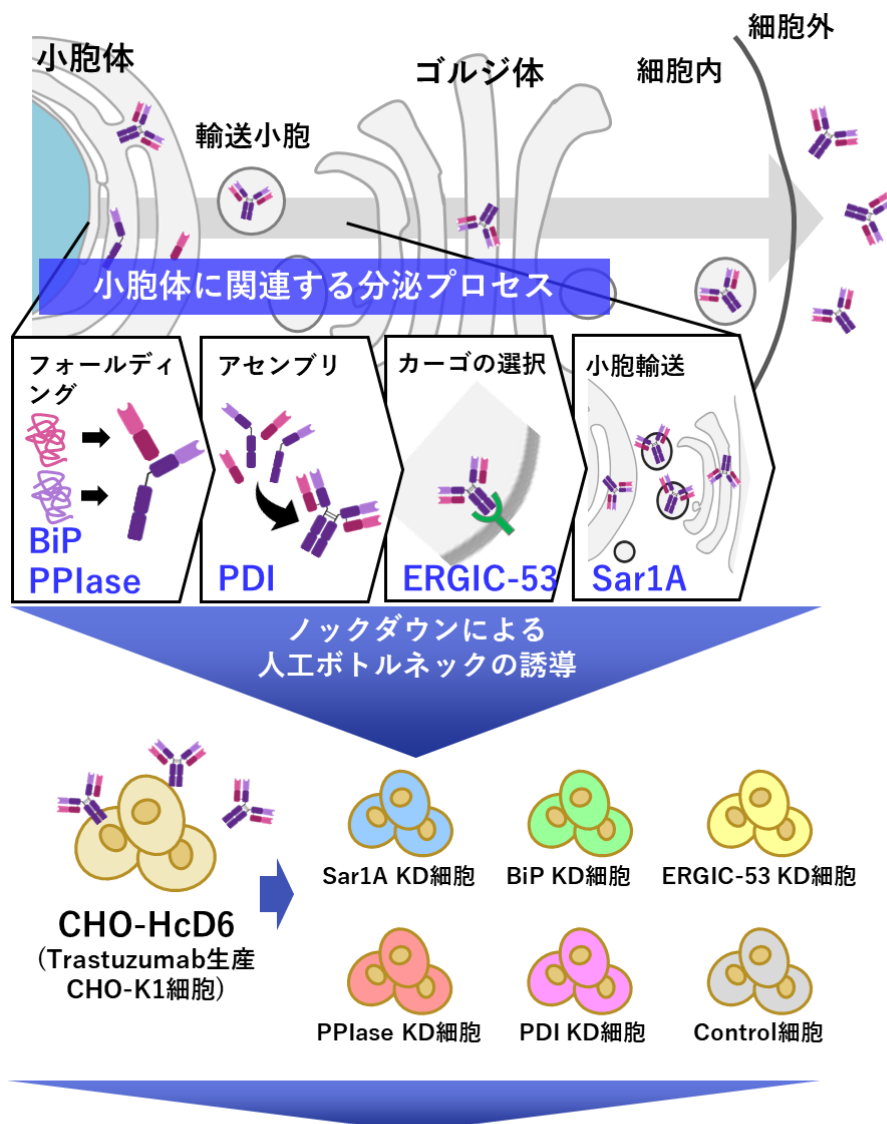
による細胞周期停止など、CHO細胞の抗体生産を向上させる戦略としてしばしば報告されている。この観点から、CHO-HcD6-Sar1A の高い比生産速度は、その低い細胞増殖に一部起因する可能性がある。一方、CHO-IgG1B における Sar1A 過剰発現は細胞増殖に影響を及ぼすことなく比生産速度を増加させた。しかしながら、CHO-IgG3 においては抗体の比生産速度に有意な変化は認められなかった。その理由の一つとして、CHO-IgG3 における抗体比生産速度が他の二種類の細胞に比べ著しく低く、転写や翻訳過程など分泌過程以外に主要なボトルネックが存在する可能性が考えられる。さらに、小胞体とゴルジ体間の輸送自体が多数の因子の相互作用を含む一連のプロセスであるため、律速段階は COPII 小胞形成以外の段階に存在する可能性も考えられる。

IgG 生産 CHO 細胞における Sar1A の過剰発現は、COPII 小胞形成の促進に伴う小胞体からゴルジ体への抗体輸送の促進を介して、比生産速度の向上および細胞内 IgG の蓄積の減少をもたらした。従って、小胞体における抗体の蓄積が分泌プロセスのボトルネックとなっている抗体生産 CHO 細胞では、Sar1A の過剰発現による COPII 小胞を介した抗体輸送の促進が抗体の比生産速度を改善させる有効な手段となりうることが示唆された。COPII 小胞による抗体輸送の促進はゴルジ体におけるプロセッシングの負荷を増大させ、高マンノース型糖鎖の増加は認められなかったものの、IgG のガラクトシル化比率をわずかに低下させた。また、COPII 小胞輸送の促進に伴う小胞体構成要素の過剰な流出やそれに伴う小胞体サイズの減少により、細胞死直前に強い UPR 誘導を引き起こした可能性がある。従って、ゴルジ体から小胞体への COPI 小胞による逆行輸送も順行輸送と同時に促進することで、小胞体構成要素をリサイクルし、小胞体の恒常性や大きさに伴うタンパク質の処理能力が維持できると考えられる。また、ゴルジ体以降における小胞輸送もボトルネックとなりうる可能性が十分にあるため、逆行輸送やゴルジ体以降の小胞輸送も含めた包括的な小胞輸送の制御を実施していくことが重要である。本章における検証はすべてフラスコ回分培養にて行われているが、実際の生産で使用するバイオリアクターを用いた場合、Sar1A の過剰発現が小胞体への恒常性へ与える影響に変化が生じると考えられる。フラスコ回分培養では培養開始後、pH の制御は行われれないのに対し、バイオリアクターを用いた場合は培養中に pH が制御される。小胞体内腔における pH は 7 付近で維持され、ゴルジ体における pH は 6.0-6.7 付近で維持され、シスゴルジからトランスゴルジにかけて最適な pH は低下する。Sar1A の過剰発現により小胞体からゴルジ体への小胞輸送が活性化することで、各オルガネラにおける最適な pH の維持が困難となり、フラスコ回分培養後期に CHO-HcD6-Sar1A 細胞において UPR が強く誘導された可能性がある。バイオリアクターで培養した際は、培養液中の pH が制御されるため、細胞がオルガネラ内の最適な pH を維持しやすくなり、UPR の強い誘導は抑制することができる可能性がある。

第三章 合理的な分泌プロセス強化に向けた人工ボトルネックの評価と応用

3.1 序章

第二章や先行研究で示されたように小胞体に関連する分泌プロセスにおけるボトルネックを同定し、改善することは非常に困難であり、その背景には分泌プロセスにおけるボトルネックと抗体生産や細胞内での抗体の動態の関係性への理解が限定的である現状がある。従って、本章では、抗体生産 CHO 細胞の小胞体に関連する分泌プロセスにおけるボトルネックが細胞の抗体生産、特に細胞内の抗体動態に与える影響を評価した（図 12）。小胞体に関連する分泌プロセスでも特に重要な、フォールディング、アセンブリ、カーゴタンパク質の選別、そして、小胞輸送という 4 つのプロセスにボトルネックを生じさせるため、それぞれのプロセスの中心を担うタンパク質、BiP, PPIase, PDI, ERGIC-53, Sar1A をそれぞれノックダウンすることで人工的に誘導されたボトルネックをもつ 5 種類の抗体生産 CHO 細胞を構築した。その 5 種類のボトルネックを有するモデル細胞を用い、そのボトルネックが抗体生産性へ与える影響を評価した。また、翻訳や細胞内小胞輸送を阻害した際の細胞内抗体及びその中間体の濃度の経時変化を解析し、ボトルネックが生じた各プロセス特有の細胞内抗体やその中間体の蓄積や減少トレンドが明らかとなった。さらに、この分泌プロファイルを活用して、3 種類の異なる抗体を生産する CHO 細胞の分泌プロファイルを比較解析し、ボトルネックの推定を行った。最後に、これら 3 種類の抗体生産 CHO 細胞で各プロセスの中心を担うタンパク質を過剰発現させ、推定の妥当性を検証し、簡易に未知のボトルネックをある程度絞り込むことができることが立証された。この研究は、分泌プロセスにおけるそれぞれのボトルネックが CHO 細胞の抗体生産および分泌プロセスに与える特徴的な影響を明らかにした。また、ここで得られた結果は特定の非常に困難な分泌プロセスにおけるボトルネックを簡易にスクリーニングし、詳細に調査をするべきプロセスを絞り込むことに貢献することが期待される。



- ✓ ボトルネックが抗体の比生産速度へ与える影響
- ✓ ボトルネックが細胞内抗体の蓄積や分泌へ与える影響
- ✓ 分泌プロファイルを用いたボトルネックの推定

図 12 小胞体に関連する分泌プロセスと第三章の概要

3.2 実験材料および実験方法

3.2.1 細胞培養

4種類の異なるIgG₁をそれぞれ生産するCHO-K1細胞由来の4種類の細胞株は6 mM L-glutamine と 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ puromycin を添加した BalanCD CHO Growth A によって継代培養した。4種類の異なるIgG₁である Trastuzumab および、Rituximab、Infliximab、

Bevacizumab を生産する細胞は CHO-HcD6 細胞 (RRID: CVCL_9Y69)⁸⁶ および、in-house の CHO-Ritx、CHO-Iflx、CHO-Bvcz 細胞とそれぞれ表記する。継代培養は 125 mL Erlenmeyer shake flasks を用いて 20 mL の培養液量で、37°C、5% CO₂、湿度 80%、140 rpm で Climo-Shaker ISF1-XC によって実施した。VCC および Viability は Vi-CELL Cell Viability Analyzer で測定した。

3.2.2 ノックダウンベクターと過剰発現ベクターの構築

Sar1A、BiP、ERGIC-53、PPIase、および PDI を CHO-HcD6 細胞にて siRNA 干渉法を用いてノックダウンするために、各遺伝子の mRNA に対する 3 種類の異なる配列を標的とするノックダウン (KD) ベクターを構築した。各遺伝子の mRNA 配列は、NCBI データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から取得したチャイニーズハムスター (*Cricetulus griseus*) の配列情報に基づき、siDirect 2.0 (<https://sidirect2.rnai.jp/>)¹¹² を用いて 3 つの標的配列を選定した。Sar1A、BiP、ERGIC-53、PPIase、PDI の参照した mRNA 配列のアクセッション番号はそれぞれ XM_003499885.3、NM_001246739.2、XM_007647552.3、XM_007650771.4、NM_001246693.2 であった。siDirect 2.0 により決定された標的配列の塩基の位置は、Sar1A が 135–157、487–509、1078–1100、BiP が 528–550、1651–1673、2188–2210、ERGIC-53 が 435–457、710–732、1075–1097、PPIase が 13–35、244–266、250–272、PDI が 1543–1565、1003–1025、1491–1513 であった。short hairpin RNA (shRNA) を発現させるため、発現ベクターには pBAsi-hU6 Neo (Takara Bio) を用い、5'末端に BamHI、3'末端に HindIII の粘着末端を有するオリゴヌクレオチドを設計した (表 2)。設計したオリゴヌクレオチドのペアとなる 2 つの塩基鎖をアニーリングし、BamHI および HindIII で消化した pBAsi-hU6 Neo にライゲーションした。構築した各ベクターは、コントロールとして用いた空ベクターとともに、AhdI (New England Biolabs, Ipswich, MA) により線状化した後、トランスフェクションに使用した。

表 2 RNA 干渉による遺伝子ノックダウンに用いた short hairpin RNA をコードする DNA 配列

Construct	Top strand (5' to 3')	Bottom strand (3' to 5')
Shr1A-s11	GATCGTAAGCATCAATTAATGCTTTTGTGAAAGCCACAGATGGAAAGACATTATTGATGGTTACCTTTTAA	AGCTTAAAAAAGATCAATTAATGCTTTTCCCATCTGTGGCTTCACAGAAAGACATTATTGATGGTTACG
Shr1A-s12	GATCGAGCTTAATGCTTTAATGACTGTGTGAAGCCACAGATGGAGTGAATTAAGACATTAAAGCTCTTTTAA	AGCTTAAAAAAGACCTTAATGCTTTAATGACTTCATCCCATCTGTGGCTTCACAGAGTCAATTAAGACATTAAAGCTCG
Shr1A-s13	GATCGAAGGTGTGTTAATGTAACTGTGAAGCCACAGATGGCAATTACATTAACAACACTTTCTTTTAA	AGCTTAAAAAAGAAGTGTGTTAATGTAACTTCOCATCTGTGGCTTCACAGAAATTACATTAAACAACACTTTGCG
Bhp-s11	GATCCGATTCAAGTGTGATTTGGAGCTGTGAAGCCACAGATGGGCTTCCCATATATCAATGCAATGGAATGCTTTTAA	AGCTTAAAAAAGATTAAGTGTGATTTGGAGGCTTCATCTGTGGCTTCACAGCTTCACAGCTTCATTAAGTGAATGGG
Bhp-s12	GATCCGAGATTAAGTGTAAATGATTTCTGTGAAGCCACAGATGGGAATTCATTAACATCTATCTCTTTTAA	AGCTTAAAAAAGATTAAGTGTAAATGATTTTCCCATCTGTGGCTTCACAGAAATTCATTAACATCTATCTGCG
Bhp-s13	GATCCGTTAAGTCTCGAATGTAAATGCTGTGAAGCCACAGATGGGCGAATTACATTCGAGAGCTTAAGTCTTTTAA	AGCTTAAAAAAGCTTAAGTCTCGAATGTAAATGGCCATCTGTGGCTTCACAGAAATTGAGACTTAAAGCTTAAAGGCG
ERGLC-s11	GATCCGCAATTGGGTATACAGAAAGCTGTGAAGCCACAGATGGGGGTGTAAAGCCATTATTGATCTTTTAA	AGCTTAAAAAAGCAATTGGGTATACAGAAAGCCCATCTGTGGGCTTCACAGAGTTCTGTAAACAATTTGGCG
ERGLC-s12	GATCCGATCAATTAATGAGCTTTACACCTGTGTGAAGCCACAGATGGGGGTGTAAAGCCATTATTGATCTTTTAA	AGCTTAAAAAAGATCAATTAATGAGCTTTACACCCCATCTGTGGCTTCACAGGGTGTAAAGCCATTATTGATCG
ERGLC-s13	GATCCGACAGAAATCGATTTCATCTGGCTGTGAAGCCACAGATGGGCCAGATGAAATTCGATTTCGCTTTTAA	AGCTTAAAAAAGACAGAAATCGATTTCATCTGGCCCATCTGTGGCTTCACAGCTTCACAGCTTCATTAAGTTCGCG
PPIase-s11	GATCCGATGTCTTAAACATTACAGCTGTGAAGCCACAGATGGGCTGTAAATGCTAAAGAACATCTTTTAA	AGCTTAAAAAAGATGTCTTAAACATTACAGCCCATCTGTGGCTTCACAGAGCTTAATGTCTAAAGAACATCG
PPIase-s12	GATCCGATCAGAACTTCATCTTAACCTGTGAAGCCACAGATGGGTTAAAGATGAATGCTGATTTCTTTTAA	AGCTTAAAAAAGATCAGAACTTCATCTTAACCCCATCTGTGGCTTCACAGATTAAAGTGAATGCTGATTTGCG
PPIase-s13	GATCCGAACTTCATCTTAAGTGTACCTGTGAAGCCACAGATGGGTAACACTTAAAGATGAAGTCTTTTAA	AGCTTAAAAAAGAACTTCATCTTAAGTGTACCCCATCTGTGGCTTCACAGAGTAACTTAAAGATGAAGTTCG
PDI-s11	GATCCGCTATTAAGAGACGAATTTGCTGTGAAGCCACAGATGGCTTAATTCGCTTTAAAGCTTTTAA	AGCTTAAAAAAGTATTAAGAGACGAATTTGGCCCATCTGTGGCTTCACAGCTTAACATTAATTCGCTTTAAAGCTTCG
PDI-s12	GATCCGAGAGAGATGGACAAAGCTGTGAAGCCACAGATGGGTTGTACTTGGTCACTCTCTTTTAA	AGCTTAAAAAAGAGAGATGGACAAAGCTGTGAAGCCCATCTGTGGCTTCACAGTTGTACTTGGTCACTCTTCG
PDI-s13	GATCCGATCTTGAAAGAAAGCTTTAACTGTGAAGCCACAGATGGGCTTAAGCTTCTTAAATCTTTTAA	AGCTTAAAAAAGATCTTGAAAGAAAGCTTTAAACCCCATCTGTGGCTTCACAGTCTTAAAGCTTCTTAAATCCG

各標的遺伝子を CHO-Ritx、CHO-Iflx、ならびに CHO-Bvez 細胞で過剰発現させるため、過剰発現ベクターを構築した。CHO-K1 細胞から FastGene RNA Premium Kit を用いて全 RNA を抽出し、PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit を用いて cDNA を合成した。Sar1A、BiP、ERGIC-53、PPIase、および PDI のコーディングシーケンスをそれぞれ対応するプライマー（表 3）を用いて PCR により増幅し、得られた増幅産物を pBudCE4.1 の CMV プロモーターの下流に位置する HindIII/BamHI、ScaI、SalI/BamHI、ScaI、および ScaI 部位にそれぞれ挿入した。構築した各ベクターは、コントロールとして用いた空ベクターとともに、NheI により線状化した後、トランスフェクションに使用した。

表 3 過剰発現ベクターの構築に用いたクローニングプライマー
開始コドンおよび終止コドンは赤色で示した。

Construct	Cloning forward primer (5' to3')	Cloning reverse primer (5' to3')
Sar1A-OE	ATCAAGCTTACTGCTGGTCTGTGTCTCTGAGGGA	ATCGGATCCACCACTGGGCGATGAGCGTAGACAG
BiP-OE	TCGATCTTAAGCAGTATGAAGTTCCCTATGGTGGCGG	GGATCCTCTAGAAGTCAGCCCTAGCAGATCAGTACACC
ERGIC-OE	TAAGTCGACGATGGCGGGTCCAGAAGGAA	CAGGGATCCAGAGGGTAATGCCACAGTC
PPIase-OE	TCGATCTTAAGCAGTATGCTCAACCCACCGTGTTTC	GGATCCTCTAGAAGTTAGAGTTGCCACAGTCGGAAATGG
PDI-OE	TCGATCTTAAGCAGTATGCTGAGCCGTTCTCTGCTG	GGATCCTCTAGAAGTTGGTGATGCTCCCTCCTTAGGTG

3.2.3 ノックダウン細胞と過剰発現細胞の構築

CHO-HcD6 細胞を構築した KD ベクターを用いて Neon Transfection System により、トランスフェクションした。対数増殖期にある 5×10^5 個の細胞に 1 μ g のベクターを導入し、12-well プレートに播種した。各安定発現細胞は、6 mM L-glutamine、1,200 μ g mL⁻¹ G418 (InvivoGen)、および 3% [v/v] FBS を含む BalanCD CHO Growth A で、37°C、5% CO₂ 条件下にて選択を行った。選択後、培養液量 20 mL の 125 mL shake flask にスケールアップし、6 mM L-glutamine、15 μ g mL⁻¹ puromycin、および 1,000 μ g mL⁻¹ G418 を含む BalanCD CHO Growth A で継代培養した。最終的に、各 KD ベクターに対して 2 つの細胞プールを得たため、各 KD 標的遺伝子に対して 6 つの細胞プール、および 2 つのコントロール細胞プールを取得した(表 4)。

表 4 KD ベクターによって構築された KD 細胞プール

Used vector	Constructed cell pools
Sar1A-si1	HcD6-Sa1-A, HcD6-Sa1-B
Sar1A-si2	HcD6-Sa2-A, HcD6-Sa2-B
Sar1A-si3	HcD6-Sa3-A, HcD6-Sa3-B
BiP-si1	HcD6-Bi1-A, HcD6-Bi1-B
BiP-si2	HcD6-Bi2-A, HcD6-Bi2-B
BiP-si3	HcD6-Bi3-A, HcD6-Bi3-B
ERGIC-si1	HcD6-Er1-A, HcD6-Er1-B
ERGIC-si2	HcD6-Er2-A, HcD6-Er2-B
ERGIC-si3	HcD6-Er3-A, HcD6-Er3-B
PPIase-si1	HcD6-Pp1-A, HcD6-Pp1-B
PPIase-si2	HcD6-Pp2-A, HcD6-Pp2-B
PPIase-si3	HcD6-Pp3-A, HcD6-Pp3-B
PDI-si1	HcD6-Pd1-A, HcD6-Pd1-B
PDI-si2	HcD6-Pd2-A, HcD6-Pd2-B
PDI-si3	HcD6-Pd3-A, HcD6-Pd3-B
Empty-1	HcD6-Em-A, HcD6-Em-B

CHO-Ritx、CHO-Iflx、および CHO-Bvcz 細胞についても、構築した過剰発現ベクターおよび空ベクターを用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクションおよび安定発現株の選択は上述と同様に実施し、選択には $450 \mu\text{g mL}^{-1}$ Zeocin を用いた。選択後、培養液量 20 mL の 125 mL shake flask にスケールアップし、6 mM L-glutamine、 $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ puromycin、および $225 \mu\text{g mL}^{-1}$ Zeocin を含む BalanCD CHO Growth A で継代培養した。CHO-Ritx、CHO-Iflx、CHO-Bvcz 由来の各細胞プールは、それぞれ Sar1A、BiP、ERGIC-53、PPIase、または PDI を過剰発現させた細胞プール、ならびにそれぞれに対するコントロール細胞プールを構築した。これらの細胞プールは、それぞれ、CHO-Ritx 細胞に由来するものは、Ritx-Sar1A、Ritx-BiP、Ritx-ERGIC-53、Ritx-PPIase、Ritx-PDI、Ritx-Mock、CHO-Iflx 細胞に由来するものは、Iflx-Sar1A、Iflx-BiP、Iflx-ERGIC-53、Iflx-PPIase、Iflx-PDI、Iflx-Mock、そして CHO-Bvcz 細胞に由来するものは、Bvcz-Sar1A、Bvcz-BiP、Bvcz-ERGIC-53、Bvcz-PPIase、Bvcz-PDI、Bvcz-Mock と命名した。

3.2.4 シングルセルクローニング

限界希釈法により、各標的遺伝子の発現量が最も低い KD 細胞のシングルセル由来のクローンを単離した。KD 細胞を 96-well plate (Corning) に $0.6 \text{ cells mL}^{-1}$ となるように播種し、6 mM L-glutamine、 $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ puromycin、および $1,000 \mu\text{g mL}^{-1}$ G418 を含む BalanCD CHO Growth A で培養した。Sar1A、BiP、ERGIC-53、PPIase、そして、PDI KD クローンおよびコントロールのクローンはそれぞれ 10、22、22、22、10、6 クローン取得し、mRNA の発現量を測定した。最終的に得られた Sar1A、BiP、ERGIC-53、PPIase、そして、PDI KD クローンおよびコントロールのクローンは HcD6-S2A-A10、

HcD6-B2A-A11、HcD6-E2A-C09、HcD6-P1A-B02、HcD6-D1B-A11、そして HcD6-Emp-A10 細胞と命名した。

3.2.5 回分培養

構築した KD 細胞プールの回分培養は 125 mL Erlenmeyer shake flasks を用いて 30 mL の培養液量で、37°C、5% CO₂、湿度 80%、140 rpm で Climo-Shaker ISF1-XC に よって実施した。使用した培地は 6 mM L-glutamine を添加した BalanCD CHO Growth A である。細胞播種濃度は 5×10^5 cells mL⁻¹ とした。毎日 500 μ L の培養液をサンプリング し、VCC および Viability を測定した。回収された培養上清は上述と同様にサンドイッチ ELISA 法による抗体濃度の定量に使用した。また、対数増殖期に回収された細胞ペレット を用いて上述と同じ方法で real-time PCR を実施し、KD 標的遺伝子および、ハウスキー ピング遺伝子である β -actin の mRNA 相対発現量を定量した。使用したプライマーは表 5 に記載する。

表 5 第三章の real-time PCR に使用されたプライマー

Target	qPCR forward primer (5' to3')	qPCR reverse primer (5' to3')
β -actin	ACTCCTACGTGGGTGACGAG	AGGTGTGGTGCCAGATCTC
Sar1A	GCGGATCATTCTCGTCTCATGGAAT	TTCAGTATTGCATCTGTCCTGTCA
BiP	TCGGTGGGTCTACTCGGATT	GACAGCAGCACCGTATGCTA
ERGIC-53	CGAGTGAAGAGAGGTCGAA	CAACACCATTCCACATATCAGC
PPIase	TTCATGTGCCAGGGTGTGTA	GTTTGGTCCAGCATTTGCCA
PDI	CCCGAATATGCCAAAGCTG	CCATACTGCTGAGCCAGGTC

構築した過剰発現細胞プールの回分培養は Duetz System の 24-well deep well plates (Kühner)で行い、ガス交換および 24-well deep well plates のシェーカーへの固定 には sandwich covers (Kühner)および clamp systems (Kühner)を用いた¹¹³。また、回分 培養は 3 mL の培養液量で、37°C、5% CO₂、湿度 80%、300 rpm で Climo-Shaker ISF1- XC に よって実施した。使用した培地は 6 mM L-glutamine を添加した BalanCD CHO Growth A である。細胞播種濃度は 5×10^5 cells mL⁻¹ とした。培養液のサンプリングは毎日 実施され、各サンプリングにて回収した 200 μ L の培養液を用いて、上述と同様の方法で、 VCC、Viability、抗体濃度、過剰発現標的遺伝子および β -actin の mRNA 相対発現量を測 定した。細胞の対数増殖期は上記の方法で決定し、対数増殖期における抗体の比生産速度 も同様に上記の方法で計算した。

3.2.6 小胞輸送阻害剤 Brefeldin A (BFA)添加・除去アッセイ

HcD6-S2A-A10、HcD6-B2A-A11、HcD6-E2A-C09、HcD6-P1A-B02、HcD6- D1B-A11、そして、HcD6-Emp-A10 細胞を培養液量 30 mL の 125 mL Erlenmeyer shake

flasks に 2×10^6 cells mL⁻¹ で播種し、上記の回分培養と同様の条件で培養した。小胞体とゴルジ体間の可逆的な小胞輸送阻害剤である Brefeldin A (BFA) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ となるように添加し、8 時間培養し、阻害剤の添加から 0, 1, 2, 4, 6, 8 時間後にサンプリングした。BFA 添加から 8 時間後、培養液中の細胞を $100 \times g$ で 5 分間、室温で遠心分離し、細胞を回収した。回収された細胞は PBS で一度洗浄され、 $100 \times g$ で 5 分間、室温で遠心分離し、PBS を除去した。細胞を回収した際の細胞濃度になるように BFA を含まない 6 mM L-glutamine を添加した BalanCD CHO Growth A に再び播種し、BFA 除去から 4 時間培養し、阻害剤除去後、0, 0.5, 1, 2, 4 時間後にサンプリングした。BFA 添加から 8 時間、BFA 除去から 4 時間、サンプリングを行い、回分培養と同様に VCC, Viability、細胞直径を測定し、細胞ペレットも回収した。回収された細胞ペレットは 1% [v/v] protease inhibitor cocktail を含む RIPA buffer により溶解し、定量的ウェスタンブロットに使用した。CHO-Ritx、CHO-Iflx、CHO-Bvcz の BFA 添加アッセイも同様の方法で実施した。

3.2.7 翻訳阻害剤 Cycloheximide (CHX) 添加・除去アッセイ

HcD6-S2A-A10、HcD6-B2A-A11、HcD6-E2A-C09、HcD6-P1A-B02、HcD6-D1B-A11、そして、HcD6-Emp-A10 細胞を培養液量 30 mL の 125 mL Erlenmeyer shake flasks に 2×10^6 cells mL⁻¹ で播種し、上記の回分培養と同様の条件で培養した。CHX を $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ となるように添加し、8 時間培養し、阻害剤の添加から 0, 1, 2, 4, 6, 8 時間後にサンプリングした。CHX 添加から 8 時間後、培養液中の細胞を $100 \times g$ で 5 分間、室温で遠心分離し、細胞を回収した。回収した細胞は PBS で一度洗浄し、 $100 \times g$ で 5 分間、室温で遠心分離し、PBS を除去した。細胞を回収した際の細胞濃度になるように CHX を含まない 6 mM L-glutamine を添加した BalanCD CHO Growth A に再び播種し、CHX 除去から 4 時間培養し、阻害剤除去後、0, 0.5, 1, 2, 4 時間後にサンプリングした。CHX 添加から 8 時間、CHX 除去から 4 時間、サンプリングを行い、回分培養と同様に VCC, Viability、細胞直径を測定し、細胞ペレットも回収した。回収された細胞ペレットは 1% [v/v] protease inhibitor cocktail を含む RIPA buffer により溶解し、定量的ウェスタンブロットに使用した。CHO-Ritx、CHO-Iflx、CHO-Bvcz の CHX 添加アッセイも同様の方法で実施した。

3.2.8 定量的ウェスタンブロット

BFA 添加・除去アッセイおよび、CHX 添加・除去アッセイを通じて得られたライセートを用いて、定量的ウェスタンブロットによる細胞内抗体およびその中間体の濃度の定量を行った。キャピラリー電気泳動に基づく非還元 SDS-PAGE および、ウェスタンブロットは Jess Automated Western Blot System (ProteinSimple, San Jose, CA) によって実施した。ライセート中の総タンパク質濃度は Pierce BCA Protein Assay Kit を用いて

測定した。0.8-1200 ng μL^{-1} lysates を 40 nL、12 to 230 kDa Jess separation module (ProteinSimple) にロードし、分子量に基づいて、細胞内抗体とその中間体を分離した。分離された細胞内抗体とその中間体は 1:200 に希釈された Rabbit Anti-Human IgG H&L (HRP) (ab6759) を一次抗体として、さらに、二次抗体を含む検出キットである Anti-Rabbit Detection Module (ProteinSimple)を用いて検出した。細胞内抗体およびその中間体の濃度は分離、検出され、Gaussian peak fit distribution によって決定したピーク面積に基づき、Compass for SW software (v6.2.0) (ProteinSimple) を用いて定量した。総タンパク質量と細胞体積は一般的に線形関係にあることが知られている¹¹⁴。従って、1 細胞あたりの細胞内抗体とその中間体濃度はキャピラリーにロードした総タンパク質量および、分離、検出された目的タンパク質濃度、そして、細胞は球体であるという仮定に基づき、細胞ペレットの回収時の細胞直径から計算された細胞体積から計算した。

3.3. 結果

3.3.1 人工分泌ボトルネックが抗体の比生産速度へ与える影響の評価

小胞体に関連した分泌プロセスにおけるボトルネックが CHO 細胞の抗体生産に与える影響を解析するために、各プロセスを担うタンパク質をノックダウンすることで人工的にボトルネックを誘導した。構築した KD 細胞プールを用いてフラスコ回分培養を行った。各プロセスを担うタンパク質のノックダウンはほとんど細胞増殖に影響を与えなかった (図 13)。抗体濃度は Sar1A KD cell pools と BiP KD cell pools、ERGIC-53 KD cell pools は培養を通じてコントロールとほとんど同等であり、培養 7 日目における最終的な抗体濃度はコントロールの平均である 146 mg L^{-1} に対してそれぞれ 108-139, 126-154, 117-141 mg L^{-1} であった (図 14A-C)。PPIase KD cell pools と PDI KD cell pools の抗体濃度は培養を通じてコントロールより低く、最終的な抗体濃度はそれぞれ 81.3-102 mg L^{-1} と 110-123 mg L^{-1} であった (図 14D, E)。フラスコ回分培養の対数増殖期における抗体の比生産速度と対数増殖期である 2 日目の KD 標的遺伝子の mRNA 発現量をそれぞれプロットした (図 15)。同じベクターを用いて構築されたそれぞれ 2 つのプールは全体的に比較的近い位置にプロットされた。これらのプロットに対して、最小二乗法による線形近似を行い、決定係数を算出した。対数増殖期の比生産速度はコントロール細胞の平均が 4.63 pg $\text{cell}^{-1} \text{day}^{-1}$ であった。Sar1A KD cell pools、BiP KD cell pools、ERGIC-53 KD cell pools、PPIase KD cell pools、そして PDI KD cell pools の比生産速度の平均はそれぞれ、3.58, 4.67, 4.22, 4.00, 3.77 pg $\text{cell}^{-1} \text{day}^{-1}$ であった。近似直線の傾きは高いものから順に PDI KD cell pools、PPIase KD cell pools、Sar1A KD cell pools で、2.38, 1.01, 0.934 であった。また、近似直線の決定係数も同じ順に高かった。BiP KD cell pools と ERGIC-53 KD cell pools はコントロールと比較して KD 標的遺伝子の発現量がほとんど変わっておらず、抗体の比生産速度もあまり変化がなかった。その結果、近似直線の傾きはそれぞれ -0.665 と 0.053 であった。PDI や PPIase、Sar1A の発現量の低下によって生じたアセンブリや、フ

オールディング、小胞輸送におけるボトルネックが抗体の比生産速度を低下させることが明らかとなった。特に PDI の発現量の減少は5つの標的遺伝子の中で最も線形的に抗体の比生産速度を減少させた。さらに、近似直線の傾きの大きさから、PDI の発現量の減少が最も大きく抗体の比生産速度に影響を与えることが示された。

より深刻なボトルネックを分泌プロセスに生じさせた細胞を用いて BFA アッセイや CHX アッセイを行うため、構築されたセルプールからシングルセルを単離した。Sar1A KD cell pools、BiP KD cell pools、ERGIC-53 KD cell pools、PPIase KD cell pools、PDI KD cell pools、そしてコントロールである HcD6-Sa2-A、HcD6-Bi2-A、HcD6-Er2-A、HcD6-Pp1-A、HcD6-Pd1-B、HcD6-Em-B からそれぞれ HcD6-S2A-A10、HcD6-B2A-A11、HcD6-E2A-C09、HcD6-P1A-B02、HcD6-D1B-A11、そして HcD6-Emp-A10 を取得した。これらの細胞をフラスコ回分培養し、2 日目に回収された細胞ペレットを用いて、KD 標的遺伝子の mRNA 発現量を確認した。すべてのクローンにおいて KD 標的遺伝子の発現量はコントロールと比較して有意に低かった (図 16)。

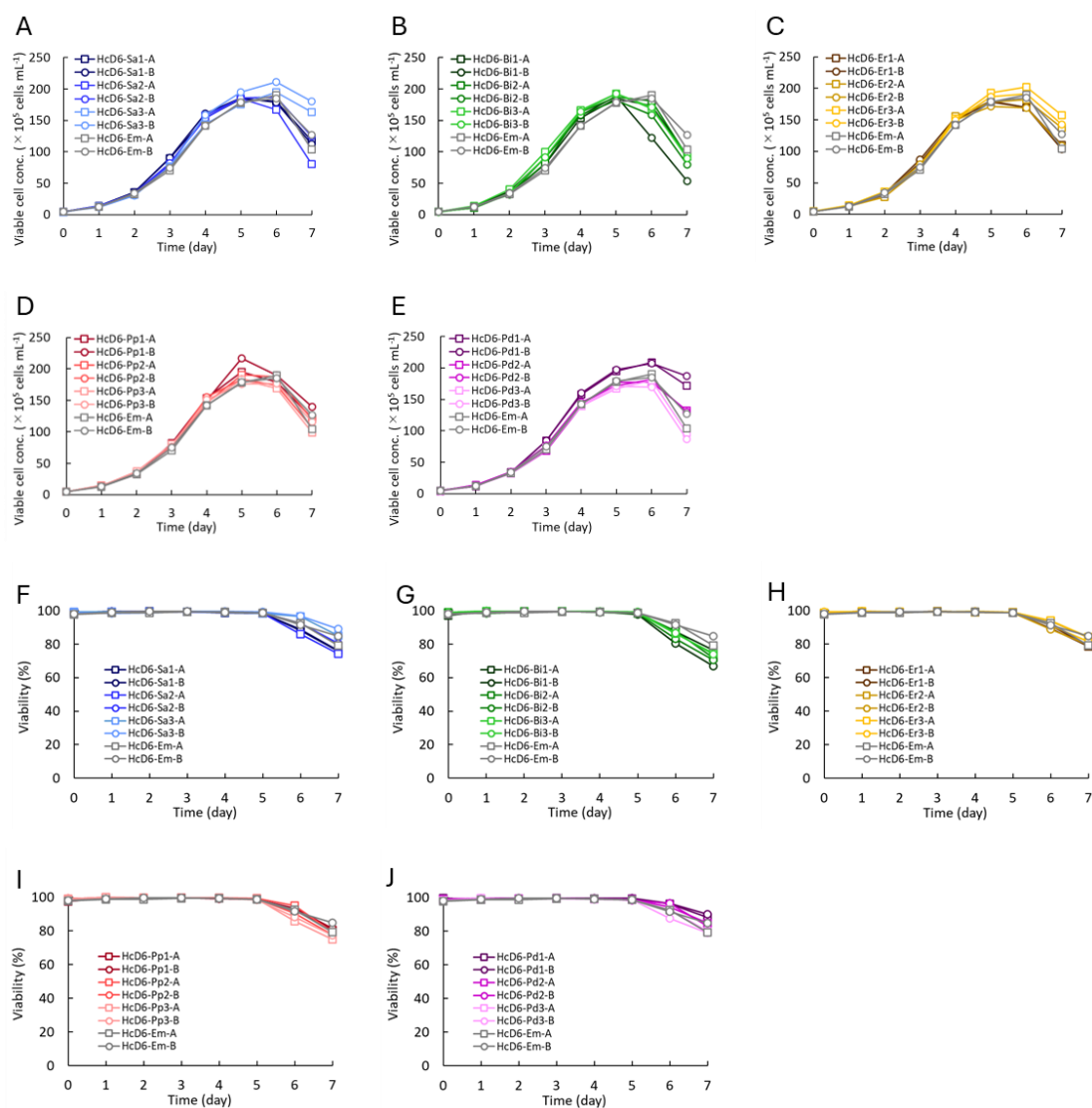


図 13 KD 細胞の回分培養における細胞増殖

(A) Sar1A KD、(B) BiP KD、(C) ERGIC-53 KD、(D) PPIase KD、および (E) PDI KD cell pools の VCC、(F) Sar1A KD、(G) BiP KD、(H) ERGIC-53 KD、(I) PPIase KD、および (J) PDI KD cell pools の Viability

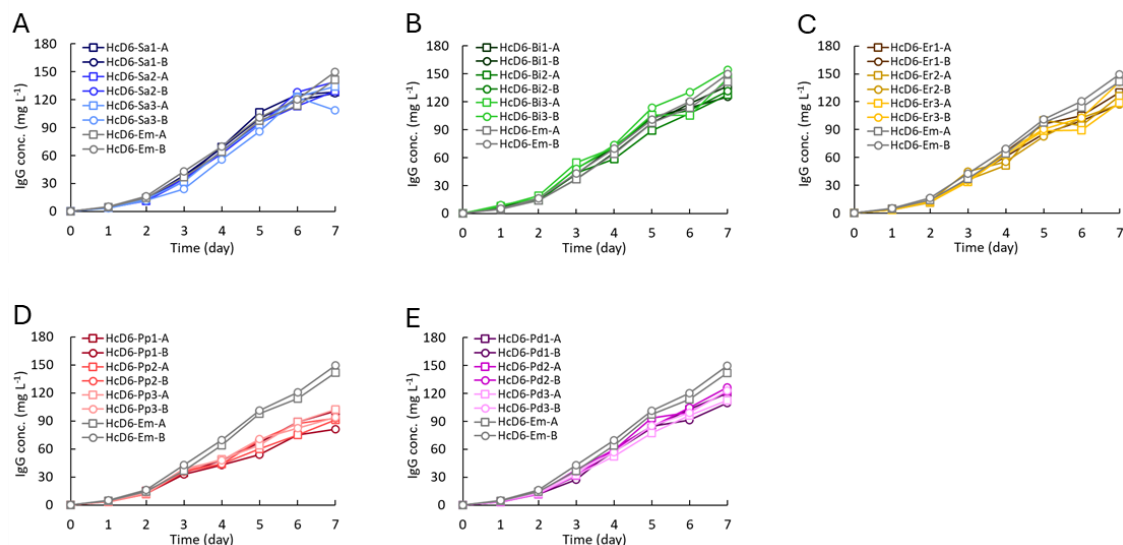


図 14 KD 細胞の回分培養における抗体濃度
(A) Sar1A KD、(B) BiP KD、(C) ERGIC-53 KD、(D) PPIase KD、および (E) PDI KD cell pools の抗体濃度

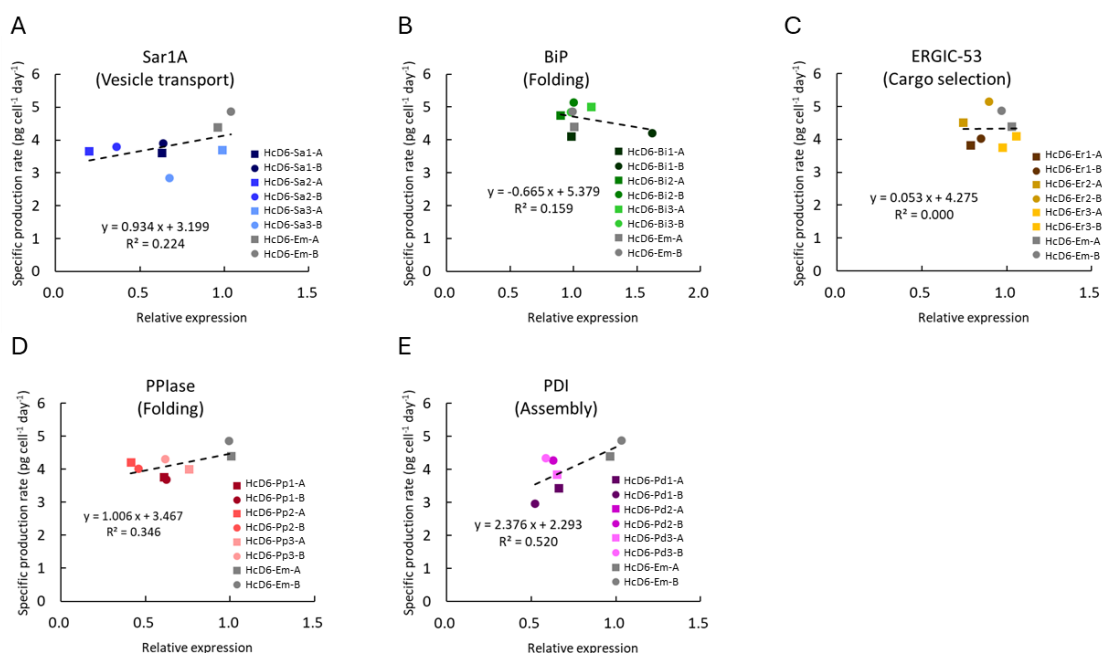


図 15 KD 標的遺伝子の mRNA 発現量と抗体の比生産速度の関係
(A) Sar1A KD、(B) BiP KD、(C) ERGIC-53 KD、(D) PPIase KD、および (E) PDI KD cell pools の KD 標的遺伝子の mRNA 発現量と対数増殖期における比生産速度の関係

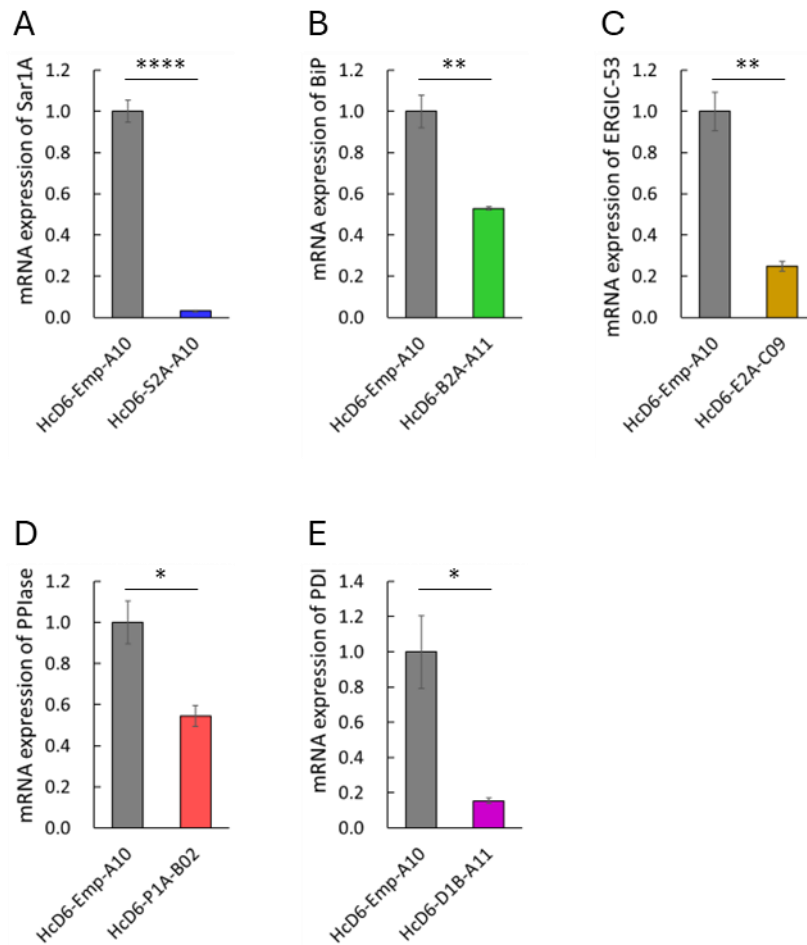


図 16 シングルセル単離された KD クローンの KD 標的遺伝子の mRNA 発現量

(A) Sar1A KD、(B) BiP KD、(C) ERGIC-53 KD、(D) PPIase KD、および (E) PDI KD クローンの回分培養 2 日目における KD 標的遺伝子の mRNA 発現量

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. ns, non-significant、エラーバーは $\pm$ SE を表す。(n=3))

3.3.2 人工分泌ボトルネックが細胞内抗体の蓄積に与える影響の解析

小胞体に関連する分泌プロセスにおけるそれぞれのボトルネックが細胞内における抗体やその中間体の蓄積に与える影響を調査するために、BFA を用いて小胞体からゴルジ体への小胞輸送を阻害し、細胞内抗体とその中間体の濃度変化を解析した (図 17)。細胞を 8 時間の間、可逆的小胞輸送阻害剤である BFA で処理した後、BFA を除去し、細胞内抗体と中間体の蓄積が解消される過程を解析した (図 18)。LC の細胞内濃度は HcD6-E2A-C09 が BFA 添加後 4 時間でピークである $0.00898 \text{ pg cell}^{-1}$ を示した (図 17A)。HcD6-E2A-C09 は BFA 添加後 1 時間を除き、BFA 添加アッセイを通じて他の細胞よりも高い細胞内 LC 濃度を示した。BFA の除去後も HcD6-E2A-C09 はほとんどのデータポイント

ントで他の細胞よりも高いLCの細胞内濃度を示した (図 18A)。HcD6-B2A-A11 と HcD6-D1B-A11 の細胞内 LC 濃度は他の細胞と比べて BFA の添加後と除去後、両方で変化が乏しかった。HC は IgG や他の中間体と比較して初期濃度が低く、HcD6-S2A-A10 が最も高い、 $0.00113 \text{ pg cell}^{-1}$ を示した (図 17B)。アッセイを通じて大きな濃度変化が少なかった LC に対して、BFA 添加後 8 時間でどの細胞においても細胞内 HC 濃度は増加し、BFA 除去後 4 時間で減少した (図 17B, 18B)。細胞内 HC₂ の初期濃度は HcD6-S2A-A10 が $0.0660 \text{ pg cell}^{-1}$ であり、それ以外の細胞は $0.0147\text{-}0.0250 \text{ pg cell}^{-1}$ であった (図 17C)。HcD6-B2A-A11、HcD6-E2A-C09、HcD6-E2A-C09 はコントロールである HcD6-Emp-A10 と同様に BFA 添加後から緩やかに増加した。HcD6-D1B-A11 は細胞内 HC₂ の初期濃度がこれらの細胞と同程度であったにも関わらず、BFA 添加から 8 時間後には $0.118 \text{ pg cell}^{-1}$ となり、BFA 除去後に更に増加し、最終的にはすべての細胞より高い、 $0.146 \text{ pg cell}^{-1}$ を示した (図 17C、図 18C)。HcD6-S2A-A10 は BFA 添加 4 時間後から急激な細胞内 HC₂ 濃度の増加を示した。細胞内 HC₂LC 濃度は HcD6-E2A-C09 と HcD6-D1B-A11 はコントロールと類似した傾向を示したが、HcD6-B2A-A11 と HcD6-P1A-B02 はコントロールよりも緩やかに増加した (図 17D)。HcD6-S2A-A10 の細胞内 HC₂LC 濃度は BFA の添加後、除去後を通じてすべての細胞で最も高かった (図 17D, 18D)。細胞内 HC₂LC と同様に、HcD6-E2A-C09 と HcD6-D1B-A11 の細胞内 IgG 濃度は BFA 添加後コントロールと類似して増加した (図 17E)。HcD6-B2A-A11 と HcD6-P1A-B02 の細胞内 IgG 濃度はコントロールよりも緩やかに増加し、BFA 添加後 4 時間でプラトーに達したが、BFA 除去後の変化は殆どなかった (図 18E)。HcD6-S2A-A10 の細胞内 IgG の初期濃度は $0.871 \text{ pg cell}^{-1}$ であり、BFA 添加から 8 時間後にすべての細胞の中で最大の $1.67 \text{ pg cell}^{-1}$ に達した。

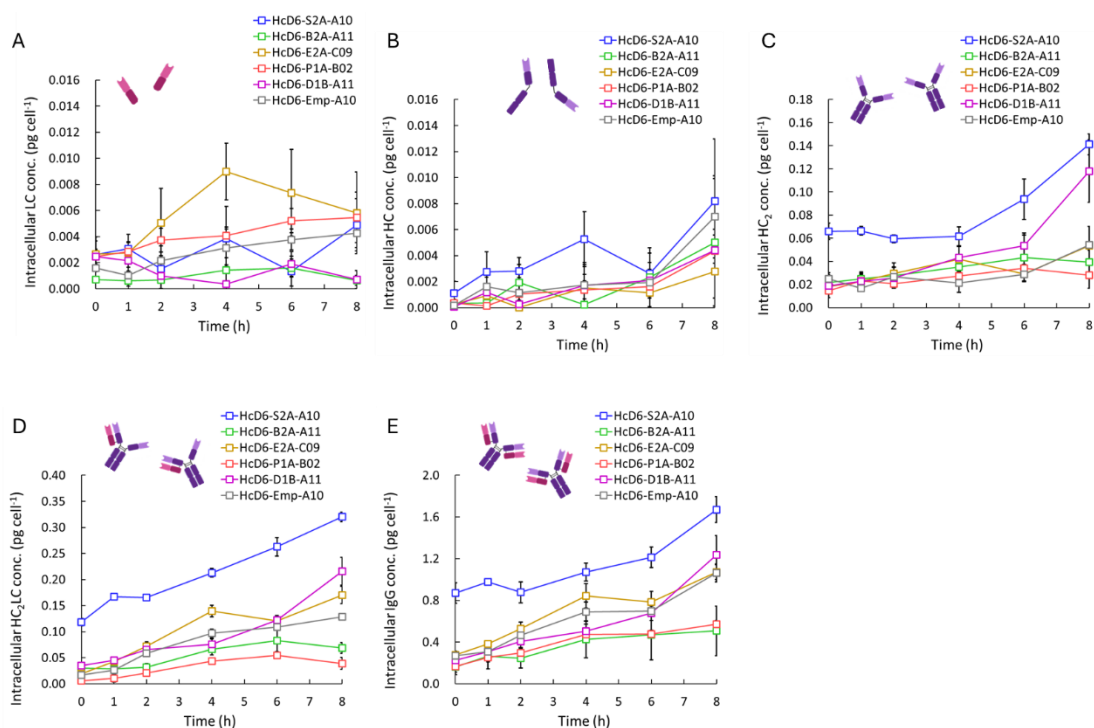


図 17 BFA 添加アッセイにおける細胞内抗体と中間体濃度
BFA 添加後 8 時間における KD クローンの細胞内の (A) LC、(B) HC、(C) HC₂、(D) HC₂LC、(E) IgG 濃度の変化
(エラーバーは±SE を表す。(n=3))

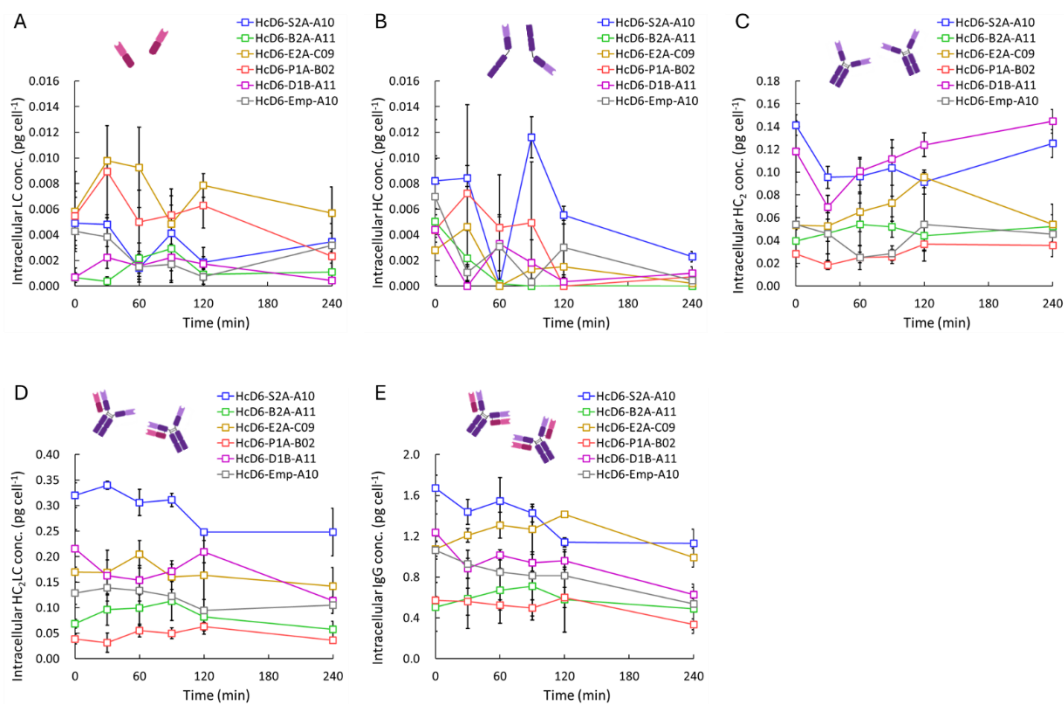


図 18 BFA 除去アッセイにおける細胞内抗体と中間体濃度

BFA 除去後 4 時間における KD クローンの細胞内の (A) LC、(B) HC、(C) HC₂、(D) HC₂LC、(E) IgG 濃度の変化

(エラーバーは±SE を表す。(n=3))

3.3.3 人工分泌ボトルネックが細胞内抗体の分泌に与える影響の解析

小胞体に関連する分泌プロセスにおけるボトルネックが細胞内抗体やその中間体の分泌に与える影響を明らかにするために、可逆的翻訳阻害剤である CHX で細胞の翻訳を停止し、8 時間細胞内抗体やその中間体濃度の変化を解析した (図 19)。その後、CHX を除去してから 4 時間、翻訳再開後の細胞内抗体やその中間体濃度の変化を解析した (図 20)。CHX の添加後、HcD6-B2A-A11、HcD6-E2A-C09、HcD6-D1B-A11 の細胞内 LC 濃度はコントロールである HcD6-Emp-A10 と同様に減少した (図 19A)。HcD6-P1A-B02 の細胞内 LC の初期濃度は $0.000547 \text{ pg cell}^{-1}$ と最も低く、CHX 添加 2 時間後にプラトーに達し、それ以上はほとんど減少しなかった。CHX 除去後の HcD6-E2A-C09 と HcD6-D1B-A11 の細胞内 LC 濃度はコントロールと類似して 1 時間で急増したが、その後 1 時間で減少した (図 20A)。細胞内 HC の初期濃度は HcD6-P1A-B02 が最も高く、 $0.00205 \text{ pg cell}^{-1}$ であった (図 19B)。HcD6-P1A-B02 の細胞内 HC 濃度は CHX 添加後 4 時間でプラトーに達し、それ以外の細胞の細胞内 HC 濃度は 2 時間後にプラトーに達した。HcD6-E2A-C09 と HcD6-D1B-A11 の細胞内 HC 濃度は CHX 除去後 1.5 時間から 2 時間にかけて急増した (図 20B)。HcD6-P1A-B02 の細胞内 HC 濃度は CHX 除去後 2 時間で増加したが、4 時間後には CHX 除去時よりも低い値を示した。BFA アッセイではほとんど検出されなかった細胞内 HCLC が CHX アッセイでは検出された (図 19C, 20C)。HcD6-B2A-A11 と HcD6-E2A-C09 はコントロールと同様に細胞内 HCLC 濃度は CHX 添加から 4 時間後にピークとなりその後、減少した (図 19C)。HcD6-P1A-B02 と HcD6-D1B-A11 の細胞内 HCLC 濃度はそれぞれ CHX 添加から 2 時間と 6 時間がピークであった。HcD6-B2A-A11、HcD6-E2A-C09、HcD6-D1B-A11 の細胞内 HCLC 濃度はコントロールに類似して、CHX 除去後 1 時間は増加し、その後の 1 時間で急速に減少した (図 20C)。他の細胞とは異なり、HcD6-S2A-A10 の細胞内 HCLC 濃度は CHX 除去後 1 時間で減少し、その後の 1 時間で増加した。HcD6-E2A-C09 と HcD6-D1B-A11 の細胞内 HC₂ 濃度はコントロールに類似して CHX 除去後 8 時間でほとんど変化がなかった (図 19D)。最も CHX 添加時の細胞内 HC₂ 濃度が $0.0980 \text{ pg cell}^{-1}$ と高かった HcD6-S2A-A10 は CHX 添加後 8 時間減少し続け、 $0.0477 \text{ pg cell}^{-1}$ となった。HcD6-B2A-A11 と HcD6-P1A-B02 の細胞内 HC₂ 濃度は CHX 添加後 1-2 時間で増加し、その後減少した。CHX 除去後は、HcD6-S2A-A10 が 1 時間後に細胞内 HC₂ 濃度の減少を示したのに対し、それ以外の細胞は増加を示した (図 20D)。HcD6-S2A-A10 は CHX 添加後および除去後を通じて他の細胞よりも高い細胞内 HC₂LC 濃度を示した (図 19E, 20E)。HcD6-B2A-A11 は CHX 添加から 1 時間後に細胞内 HC₂LC の

増加を示した (図 19E)。その他の細胞の細胞内 HC₂LC 濃度は CHX 添加から緩やかに減少した。HcD6-S2A-A10 は細胞内 IgG 濃度もアッセイを通じて最も高く、その初期濃度は 0.968 pg cell⁻¹であった (図 19F)。HcD6-B2A-A11 と HcD6-P1A-B02 の細胞内 IgG 濃度は CHX 添加から 1-2 時間変化なく、その後に減少した。それ以外の細胞は CHX 添加後指数関数的に減少した。CHX 除去後から 4 時間後の HcD6-S2A-A10 の細胞内 IgG 濃度は除去時と同等であったのに対し、それ以外の細胞は徐々に増加した (図 20F)。

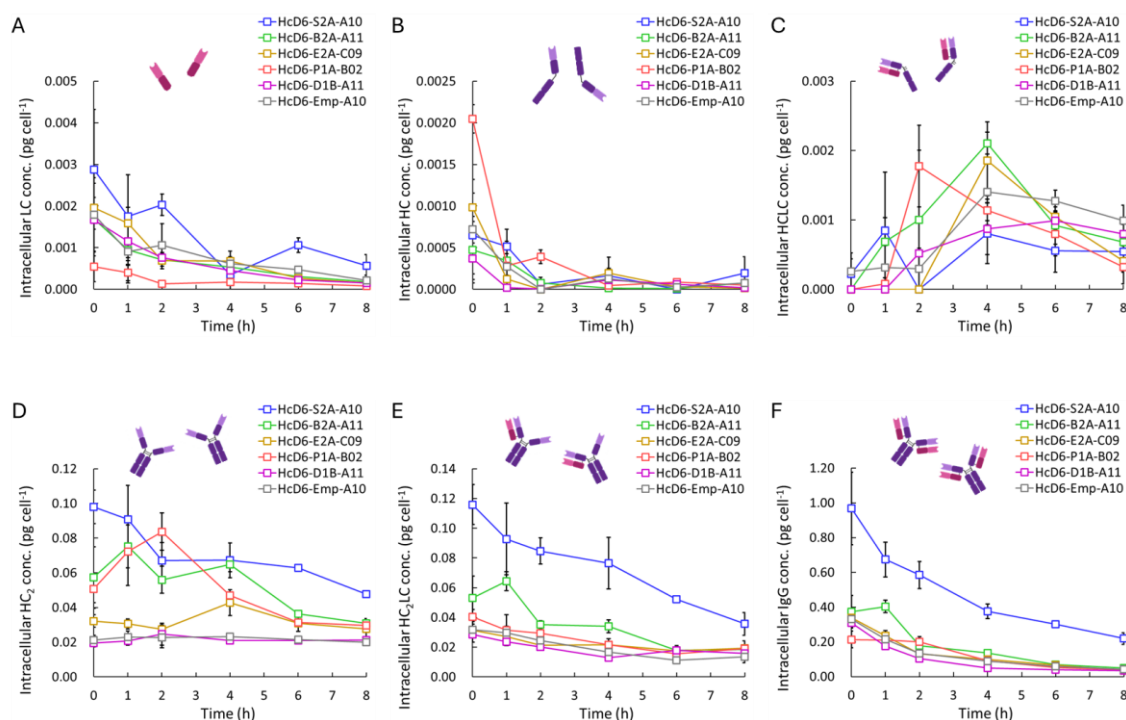


図 19 CHX 添加アッセイにおける細胞内抗体と中間体濃度

CHX 添加後 8 時間における KD クローンの細胞内の (A) LC、(B) HC、(C) HCLC、(D) HC₂、(E) HC₂LC、(F) IgG 濃度の変化 (エラーバーは±SE を表す。(n=3))

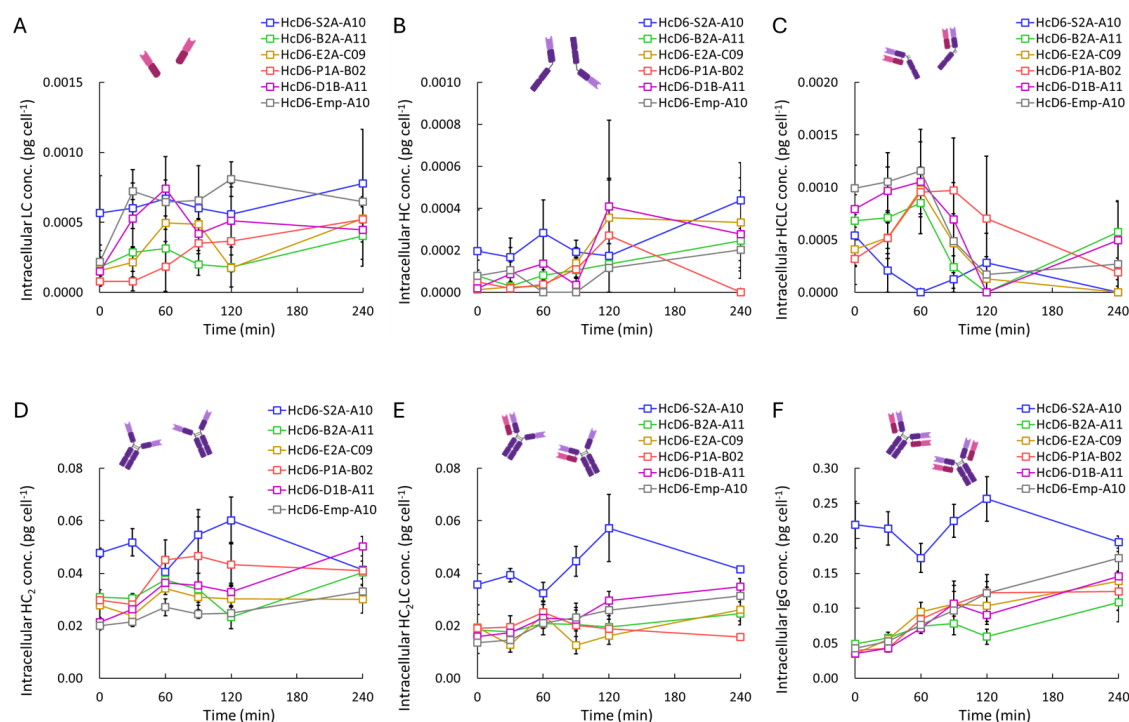


図 20 CHX 除去アッセイにおける細胞内抗体と中間体濃度
CHX 除去後 4 時間における KD クローンの細胞内の (A) LC、(B) HC、(C) HCLC、
(D) HC₂、(E) HC₂LC、(F) IgG 濃度の変化
(エラーバーは±SE を表す。(n=3))

3.3.4 CHX と BFA を用いた 3 種類の抗体生産株の分泌プロファイルの評価

ノックダウン細胞を用いて得られたボトルネックを持つ細胞の分泌プロファイルを活用して 3 種類の抗体生産 CHO 細胞、CHO-Ritx, CHO-Iflx, CHO-Bvcz のボトルネックを推定するために、これらの細胞に対しても BFA 添加アッセイ (図 21A-E) と CHX 添加アッセイ (図 21F-L) を実施した。

細胞内 LC 濃度はすべての細胞で BFA 添加後に増加したが、低い初期濃度を示した CHO-Ritx は他の細胞よりも遅れて 4 時間後に増加した (図 21A)。CHO-Bvcz の細胞内 HC の初期濃度は KD 細胞も含む全ての細胞の中で最も高い $0.000473 \text{ pg cell}^{-1}$ を示し、BFA 添加後 2 時間で減少した (図 17B, 21B)。CHO-Ritx と CHO-Bvcz の細胞内 HC₂ 濃度は BFA の添加後、緩やかに減少し、CHO-Iflx の細胞内 HC₂ 濃度は非常に低く推移した (図 21C)。CHO-Ritx の細胞内 HC₂LC 濃度は BFA 添加から 8 時間後には減少し、これは KD 細胞を含む全ての細胞では確認されなかった (図 17D, 21D)。CHO-Iflx と CHO-Bvcz の細胞内 HC₂LC 濃度は BFA 添加後増加したが、CHO-Iflx は 8 時間後も $0.0202 \text{ pg cell}^{-1}$ と非常に低かった。細胞内 IgG 濃度は BFA 添加後、すべての細胞で増加したが、CHO-Bvcz は限定的であった (図 21E)。

CHX 添加時、つまり対数増殖期の細胞内 IgG 濃度に対する各中間体の相対濃度を KD 細胞を含む全ての細胞で比較した (図 21F)。コントロールを含む KD 細胞では細胞内 IgG に対する細胞内 HC₂ と HC₂LC の相対濃度は同程度であったのに対し、CHO-Ritx, CHO-Iflx, CHO-Bvcz の細胞内 IgG に対する HC₂LC の相対濃度は HC₂ の 2 倍程度であった。CHO-Iflx の細胞内 IgG に対する細胞内 LC 濃度は他の細胞と比較して 17.3-131 倍高かった。細胞内 LC 濃度は初期濃度の非常に高かった CHO-Iflx も含め、CHX 添加後に減少した (図 21G)。CHO-Bvcz の細胞内 HC 濃度は CHX 添加後に減少したのに対し、CHO-Iflx の細胞内 HC 濃度は CHX 添加後 2 時間で増加し、その後減少した (図 21H)。細胞内 HCLC 濃度はすべての細胞で、CHX 添加後、ほとんど変化がなかったが、CHO-Bvcz では、KD 細胞を含む全ての細胞よりも高かった (図 19C, 21I)。CHO-Bvcz の細胞内 HC₂ 濃度は CHX 添加後 1 時間で増加し、CHO-Ritx の細胞内 HC₂ 濃度は CHX 添加後 6 時間減少した (図 21J)。細胞内 HC₂LC 濃度はすべての細胞で CHX 添加から 8 時間後には 0 時間より減少していたが、KD 細胞よりは緩やかに減少した (図 19E, 21K)。CHO-Iflx の細胞内 HCLC, HC₂, HC₂LC, IgG の濃度は KD 細胞も含む他の細胞と比較して非常に低かった (図 19C-F, 21I-L)。CHO-Ritx の細胞内 IgG 濃度は CHX 添加後、指数関数的に減少した (図 21L)。CHO-Bvcz の細胞内 IgG 濃度は CHX 添加後 1 時間変化なく、その後、減少した。

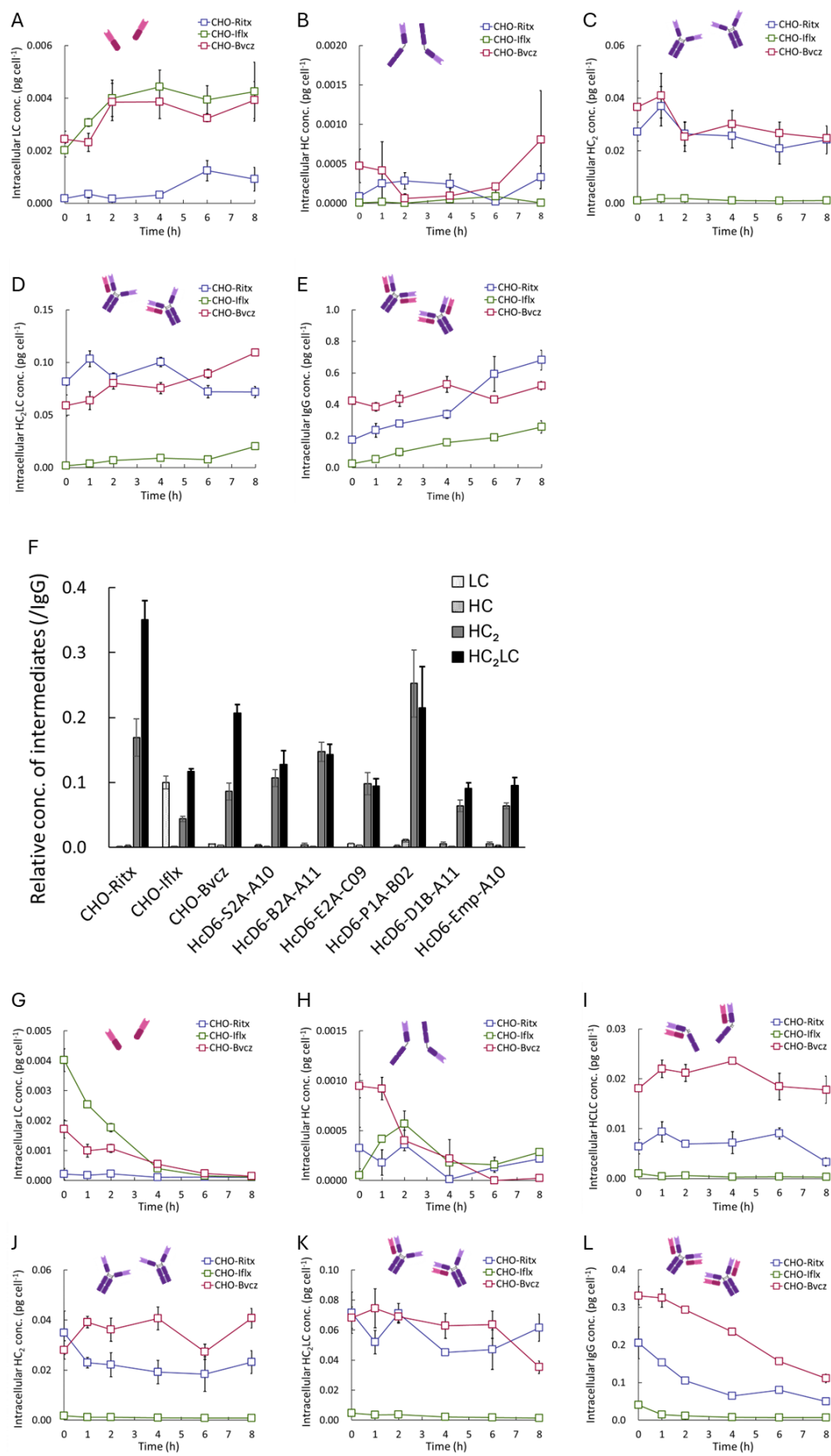


図 21 3 種類の抗体生産株の BFA 添加アッセイおよび CHX 添加アッセイにおける細胞内抗体と中間体濃度

BFA 添加後 8 時間における 3 種類の抗体生産株の細胞内の (A) LC、(B) HC、(C) HC₂、(D) HC₂LC、(E) IgG 濃度の変化、(F) CHX 添加 0 時間における KD クローンおよび 3 種類の抗体生産株の細胞内抗体に対する中間体の相対濃度、CHX 添加後 8 時間における 3 種類の抗体生産株の細胞内の (G) LC、(H) HC、(I) HCLC、(J) HC₂、(K) HC₂LC、(L) IgG 濃度の変化
(エラーバーは±SE を表す。(n=3))

3.3.5 セルエンジニアリングによる分泌プロセス強化が抗体生産へ与える影響の評価

3 種類の抗体生産 CHO 細胞、CHO-Ritx、CHO-Iflx、CHO-Bvcz における小胞体に関連する分泌プロセスの強化が抗体の生産性へ与える影響を評価し、ボトルネックの推定の妥当性を検証するために、それぞれのプロセスを担う遺伝子をアップレギュレートさせた細胞を用いて回分培養を行った。CHO-Ritx 由来の過剰発現細胞はすべて同様の細胞増殖を示したのに対し、CHO-Iflx と CHO-Bvcz 由来の過剰発現細胞は一部異なる細胞増殖を示した (図 22)。対数増殖期に回収した細胞ペレットを用いて過剰発現させた遺伝子の発現量を定量し、ほとんどの過剰発現細胞でそれぞれのコントロールの細胞より高いターゲット遺伝子の発現量が確認された (図 23)。Iflx-PPIase のみコントロールより低い過剰発現ターゲット遺伝子の発現量を示した (図 23D)。分泌プロセスを担う遺伝子の過剰発現は CHO-Ritx の抗体濃度に影響がなかった (図 24A)。CHO-Iflx 由来の過剰発現細胞の中で、Iflx-PDI が最も高い最終抗体濃度を示したが、コントロールの Iflx-Mock よりも低かった (図 24B)。CHO-Bvcz 由来の過剰発現細胞では、Bvcz-Sar1A と Bvcz-PPIase がコントロールの Bvcz-Mock よりも高い最終抗体濃度を示し、Bvcz-PDI の最終抗体濃度は他の細胞よりも顕著に低かった (図 24C)。CHO-Ritx 由来の過剰発現細胞の対数増殖期における抗体の比生産速度はすべてコントロールである Ritx-Mock の $8.33 \text{ pg cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ よりも低く、 $6.64\text{--}8.27 \text{ pg cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であった (図 24D)。CHO-Iflx 由来の過剰発現細胞の抗体の比生産速度はコントロールの Iflx-Mock の $5.25 \text{ pg cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ より有意に低く、 $1.31\text{--}3.92 \text{ pg cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であった (図 24E)。CHO-Iflx 由来の過剰発現細胞の中では Iflx-PDI が最も高い比生産速度を示した。CHO-Bvcz 由来の過剰発現細胞のコントロールである Bvcz-Mock の比生産速度は $7.18 \text{ pg cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であった (図 24F)。Bvcz-Sar1A と Bvcz-PPIase の比生産速度は Bvcz-Mock よりも 22.3%と 18.9%高く、それぞれ 8.78 と $8.54 \text{ pg cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であった。それ以外の 3 つの過剰発現細胞の比生産速度は Bvcz-Mock よりも低く、Bvcz-PDI は最も低い比生産速度、 $3.13 \text{ pg cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ を示した。

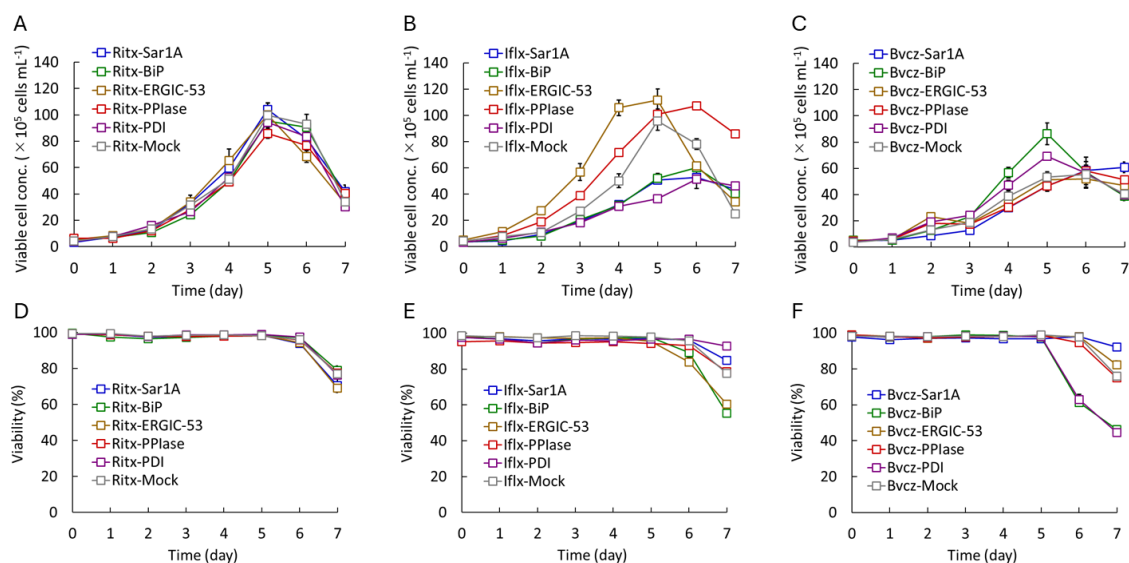


図 22 分泌プロセス関連遺伝子を過剰発現させた 3 種類の抗体生産株の回分培養における細胞増殖

(A) CHO-Ritx 由来の過剰発現株、(B) CHO-Iflx 由来の過剰発現株、(C) CHO-Bvcz 由来の過剰発現株の回分培養における VCC、(D) CHO-Ritx 由来の過剰発現株、(E) CHO-Iflx 由来の過剰発現株、(F) CHO-Bvcz 由来の過剰発現株の回分培養における Viability (エラーバーは $\pm$ SE を表す。(n=3))

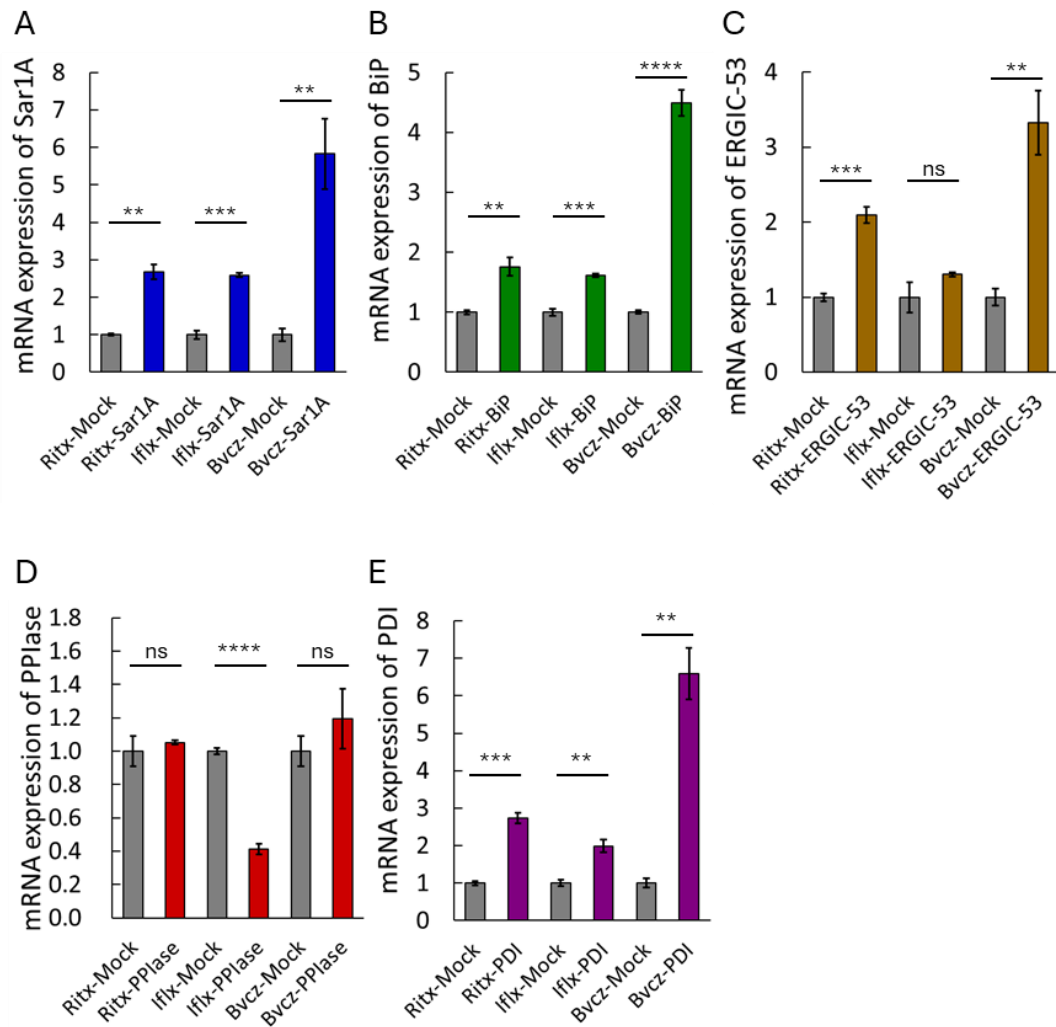


図 23 分泌プロセス関連遺伝子を過剰発現させた 3 種類の抗体生産株の回分培養における過剰発現標的遺伝子の mRNA 発現量

3 種類の抗体生産株由来の (A) Sar1A 過剰発現株、(B) BiP 過剰発現株、(C) ERGIC-53 過剰発現株、(D) PPIase 過剰発現株、(E) PDI 過剰発現株の回分培養 2 日目における過剰発現標的遺伝子の mRNA 発現量

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. ns, non-significant、エラーバーは $\pm$ SE を表す。(n=3))

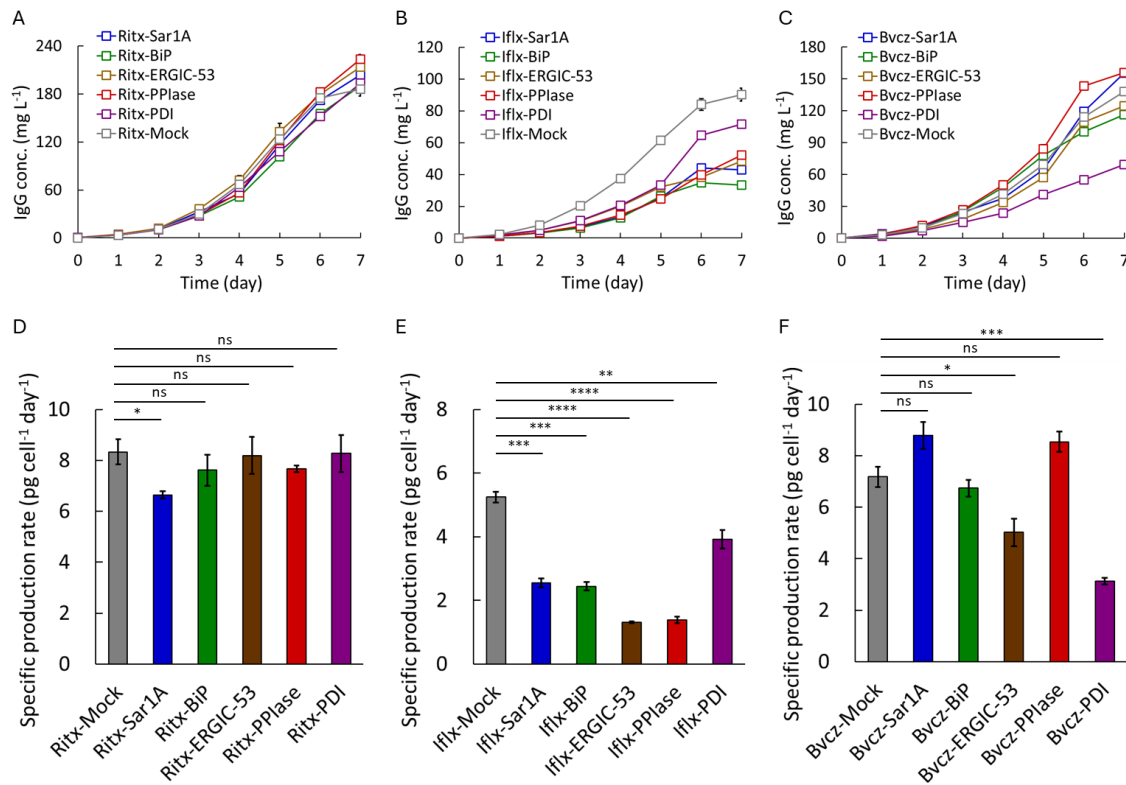


図 24 分泌プロセス関連遺伝子を過剰発現させた 3 種類の抗体生産株の回分培養における抗体濃度

(A) CHO-Ritx 由来の過剰発現株、(B) CHO-Iflx 由来の過剰発現株、(C) CHO-Bvcz 由来の過剰発現株の回分培養における抗体濃度、(A) CHO-Ritx 由来の過剰発現株、(B) CHO-Iflx 由来の過剰発現株、(C) CHO-Bvcz 由来の過剰発現株の回分培養の対数増殖期における抗体の比生産速度

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. ns, non-significant、エラーバーは $\pm$ SE を表す。(n=3))

3.4 考察

本研究では、CHO 細胞の小胞体に関連する分泌プロセスに関連遺伝子のノックダウンにより人工的にボトルネックを生じさせ、そのボトルネックが抗体生産や分泌プロセスに与える影響を解析した。人工的に生じたボトルネックが抗体の分泌に与える影響は翻訳阻害剤や小胞輸送阻害剤を用いて解析し、ボトルネックを持つ細胞の分泌プロファイルを活用して、3 種類の抗体生産 CHO 細胞のボトルネックを推定した。ボトルネックと推定されたプロセスを担う遺伝子を過剰発現させ、その推定の妥当性を検証した。

3.4.1 人工分泌ボトルネックが抗体の比生産速度へ与える影響に関する考察

小胞体に関連した分泌プロセスに人工的にボトルネックを生じさせるため、フォールディングや、アセンブリ、輸送されるタンパク質の選別、小胞輸送を担うタンパク質を CHO-K1 細胞由来の Trastuzumab IgG₁ 生産細胞、CHO-HcD6 細胞において RNA 干渉によりノックダウンした。Trastuzumab は IgG₁ モノクローナル抗体の中でも CHO 細胞で高発現、高生産細胞の確立が比較的容易であり^{115,116}、分泌プロセスに深刻なボトルネックがある可能性は比較的低いと予想されるため、分泌プロセスにボトルネックを生じさせるためのモデル細胞として Trastuzumab を生産する CHO-K1 細胞由来のクローン、CHO-HcD6 細胞を選択した。それぞれのプロセスに人工的に生じさせたボトルネックが抗体の比生産速度に与える影響を評価するために、KD 細胞プールをフラスコ回分培養し、その対数増殖期における抗体の比生産速度と KD 標的遺伝子の発現量をプロットした (図 15)。最小二乗法による線形近似により得られたプロットの近似直線の傾きと決定係数は上から PDI KD cell pools、PPiase KD cell pools、Sar1A KD cell pools の順に高かった。従って、これらのタンパク質が担う、アセンブリ、フォールディング、小胞輸送におけるボトルネックは抗体の比生産速度を低下させることが示唆された。また、抗体の比生産速度へ与える影響の大きさはそのボトルネックが生じたプロセスによって異なることも示唆された。特に PDI の KD による人工的なボトルネックは抗体の比生産速度への影響が大きく、PDI の発現量低下による、ジスルフィド結合形成能の低下は CHO 細胞の抗体生産にとって、深刻なボトルネックとなる可能性がある。BiP KD cell pools と ERGIC-53 KD cell pools はコントロールの細胞とあまり変わらない KD target 遺伝子の発現量を示した。BiP と ERGIC-53 は UPR によって発現量が増加することが報告されており¹¹⁷、IgG₁ の発現や BiP や ERGIC-53 のノックダウンにより生じた UPR によって発現量が培養 2 日目の時点でベースラインまで回復していた可能性が考えられる。

3.4.2 人工分泌ボトルネックが細胞内抗体の蓄積と分泌に与える影響に関する考察

小胞体からゴルジ体への小胞輸送を可逆的に阻害する BFA を用いて、小胞体に関連する分泌プロセスにおけるそれぞれのボトルネックが細胞内における抗体やその中間体の蓄積に与える影響を調査した (図 17、18)。BFA の添加後の細胞内抗体やその中間体濃度は人工的にボトルネックを生じさせたそれぞれのプロセスによって大きく異なっていた。輸送タンパク質の選別を担う ERGIC-53 をノックダウンさせた HcD6-E2A-C09 細胞の細胞内 LC 濃度は BFA 添加後に増加し、添加から 4 時間後にコントロールである HcD6-Emp-A10 や他の KD 細胞よりも 2 倍以上高い濃度に達した。ERGIC-53 はハイマンノース型の N-glycan を認識することが報告されている¹¹⁸。IgG₁ に結合する N-glycan は Fc 領域、つまり HC にのみ結合しているため、ERGIC-53 は LC とは直接的に関与しない。従って、BFA 添加後に HcD6-E2A-C09 の細胞内 LC 濃度だけが特徴的に増加するのは予想外であった。HcD6-D1B-A11 の細胞内 HC₂ 濃度は初期濃度が同様であった他の細胞と異なり、

BFA 添加後そして、除去後にも増加し、除去から 4 時間後には初期濃度が他の細胞よりも高かった HcD6-S2A-A10 よりも高い濃度となった。小胞体内で HC₂ に LC がアセンブリされるには PDI によってジスルフィド結合が形成される必要である。HcD6-D1B-A11 細胞のジスルフィド結合形成能は PDI のノックダウンにより他の細胞よりも低下していると考えられる。従って、BFA 添加後と除去後に高い細胞内 HC₂ 濃度を示すのはアセンブリにボトルネックを持つ細胞の特徴であると考えられる。HcD6-D1B-A11 細胞の HC₂LC 濃度は BFA アッセイを通じて他の細胞と大きく変わらなかった。HC のコンスタントドメイン CH₁ のフォールディングは非常に遅い反応であり、LC との結合によって完全に折りたたみが完成する¹¹⁹。一方、HC₂LC への LC の結合は HC₂LC が安定した構造であるので比較的早い反応であると考えられているため、HC₂LC への LC の結合よりも HC₂ への LC の結合のほうが遅く進行する可能性が高いと考えられている。従って、PDI のノックダウンは細胞内 HC₂ の蓄積を加速させた一方で、HC₂LC への影響は限定的であったと考えられる。Sar1A のノックダウンにより小胞体からゴルジ体への小胞輸送にボトルネックを有すると考えられる HcD6-S2A-A10 細胞は小胞体内への IgG の蓄積量が増加するという予想と合致して、その細胞内 IgG の初期濃度は高く、BFA 添加後のさらなる蓄積も確認された。従って、細胞内 IgG の初期濃度の高さやその後の蓄積が小胞輸送にボトルネックがある細胞の特徴であると考えられる。HcD6-S2A-A10 細胞は細胞内 IgG のみならず、細胞内 HC, HC₂, HC₂LC の初期濃度も他の細胞と比較して非常に高かった。HC₂ への LC への結合は可逆的であり、細胞内 IgG の蓄積が加速することで、基本的には安定な構造である IgG や HC₂LC 以外の中間体の組み立てに関しても動的平衡がシフトした可能性が考えられる。フォールディングに関連する BiP や PPIase をノックダウンした HcD6-B2A-A11 と HcD6-P1A-B02 細胞の細胞内 IgG 濃度は他の細胞より BFA 添加後の増加が限定的であった。フォールディングにボトルネックがある細胞は IgG まで組み立てられるまでの時間が長い可能性が高く、BFA 添加により小胞輸送を阻害しても細胞内 IgG が蓄積しにくい特徴があることが示唆された。細胞内 IgG のみならず HcD6-B2A-A11 と HcD6-P1A-B02 の細胞内の HC₂ や HC₂LC の濃度の増加も比較的緩やかであった。

タンパク質の翻訳を可逆的に阻害する CHX を用いて、小胞体に関連する分泌プロセスにおけるそれぞれのボトルネックが細胞内における抗体やその中間体の分泌に与える影響を調査した (図 19、20)。細胞内 LC および細胞内 HC 濃度は CHX 添加後にすべての細胞において減少し、添加から 8 時間後の濃度が初期濃度よりも高い細胞は存在しなかった。従って、分泌プロセスにおけるボトルネックは CHX 添加後の細胞内のそれぞれの単量体、HC と LC 濃度の変化にほとんど影響がないことが示唆された。CHX アッセイでは細胞内 HCLC が検出された。多くの IgG₁ の組み立て過程は上述のとおりであるが、環境条件依存的にまたはアイソタイプによっては IgG や HC₂LC 内の HC 鎖間のジスルフィド結合が開裂する、または細胞内 HCLC が中間体となる可能性があるため¹²⁰、HCLC のへ

テロダイマーが観察されたと考えられる。すべての細胞で細胞内 HCLC 濃度は IgG や他の中間体の濃度と異なり、CHX 添加から 8 時間で増加した。これは CHO-HcD6 由来の KD 細胞では HCLC が IgG への組み立て過程での主たる中間体ではなく、条件依存的に生じた副生成物であることを示唆している。フォールディングにボトルネックを生じさせた HcD6-B2A-A11 と HcD6-P1A-B02 細胞の細胞内 HC₂LC 濃度は CHX 添加後 1-2 時間増加した。LC のフォールディングが遅延することで、LC が HC₂ に結合する反応が遅くなると考えられる。また、HC のフォールディングの遅延は翻訳停止後も HC₂ を形成する HC を供給することにつながると考えられる。HC₂ と同様に、HcD6-B2A-A11 細胞の細胞内 HC₂LC 濃度は CHX 添加後 1 時間、特徴的に増加した。これも LC のフォールディングの遅延により IgG への組み立てが遅れていることと、翻訳停止後も HC₂ が細胞内に比較的高濃度で存在することに起因すると考えられる。従って、CHX 添加に細胞内 HC₂LC 濃度が一時的に増加するのはフォールディングにボトルネックを持つ細胞の特徴であると考えられる。さらに HcD6-B2A-A11 と HcD6-P1A-B02 細胞の細胞内 IgG は CHX 添加後 1-2 時間変化なく、その後減少した。他の細胞の細胞内 IgG 濃度は CHX 添加後、ただちに減少が始まり、8 時間後まで指数関数的に減少した。HcD6-B2A-A11 と HcD6-P1A-B02 細胞では CHX 添加後の 1-2 時間、HC₂LC への LC のアセンブリによる IgG の生成と IgG の分泌による減少が拮抗し、細胞内 IgG 濃度の減少が遅れたと考えられる。従って、この傾向もフォールディングにボトルネックが存在する細胞の特徴であると考えられる。

3.4.3 分泌プロファイルを用いた 3 種類の抗体生産株の分泌ボトルネックの推定と推定の妥当性の検証

KD 細胞を対象に行なった CHX アッセイと BFA アッセイを通じて得られた、小胞体に関連した分泌プロセスにボトルネックを持つ細胞の分泌プロファイルを活用し、異なるモノクローナル抗体生産 CHO 細胞の分泌プロセスにおけるボトルネックの推定を試みた (図 21)。この検証は IgG₁ 抗体である Rituximab、Infliximab、そして Bevacizumab をそれぞれ生産する CHO-K1 細胞由来のクローンを用いて実施された。Rituximab はフィード戦略や温度シフトで高生産を達成できる¹²¹、比較的発現が難しくないモノクローナル抗体である。BFA 添加後 8 時間の CHO-Ritx 細胞の細胞内 IgG 濃度の変化は HcD6-B2A-A11 や HcD6-P1A-B02 と類似していた。しかしながら、CHX 添加後、CHO-Ritx 細胞の細胞内 IgG 濃度は指数関数的に減少し、コントロールの HcD6-Emp-A10 細胞と類似していた。興味深いことに、細胞内 IgG 濃度とは異なり、CHO-Ritx 細胞の細胞内 HC と LC の濃度は BFA 添加アッセイと CHX 添加アッセイにおいて、ほとんどの KD 細胞より比較的低かった。その一方で、CHX 添加時の細胞内 IgG 濃度に対する HC₂LC の相対濃度は KD 細胞のみならず、CHO-Iflx や CHO-Bvcz 細胞よりも顕著に高かった。CHO-Ritx 細胞の細胞内 HC₂LC 濃度の高さはアセンブリの完了に必要な LC が不足していることを示唆しており、特に他の KD 細胞や CHO-Iflx, CHO-Bvcz 細胞と比較して CHO-Ritx 細胞の細胞

内 LC 濃度が低かった結果によって裏付けられている。従って、CHO-Ritx 細胞では分泌プロセスよりもむしろ LC のポリペプチドの供給がボトルネックとなっている可能性が高く、LC の mRNA 発現量を増加させることが抗体の比生産速度を改善すると推測される。Infliximab は他のモノクローナル抗体と比較して CHO 細胞での発現が難しい、いわゆる difficult-to-express、難発現抗体であることが知られている¹²²⁻¹²⁴。CHO-Iflx 細胞の細胞内 IgG および HC₂, HC₂LC 濃度は BFA 添加アッセイと CHX 添加アッセイを通じて KD 細胞や CHO-Ritx, CHO-Bvcz 細胞よりも顕著に低かった。しかしながら、細胞内 LC 濃度に着目すると、他の細胞と同等か、それ以上に高かった。特に、CHX 添加時における細胞内 IgG 濃度に対する細胞内 LC の相対濃度は 17.3-131 倍高く、LC のフォールディングやアセンブリにボトルネックが存在することが予測される。先行研究によって、CHO 細胞による Infliximab 生産における細胞内ボトルネックは LC のシグナルペプチドの不適切なプロセッシングに起因する LC 内のジスルフィド結合の形成のエラーであることが指摘されている^{72,73}。従って、CHO-Iflx においてフォールディングやアセンブリに関わる遺伝子をアップレギュレートすることで抗体の比生産速度が改善されることが考えられる。Bevacizumab は Rituximab と同様に CHO 細胞で比較的高発現させやすいモノクローナル抗体の一つである¹²⁵。CHO-Bvcz 細胞の細胞内 IgG 濃度は CHX 添加から 1 時間後に減少が始まり、これはフォールディングにボトルネックを生じている HcD6-B2A-A11 や HcD6-P1A-B02 細胞と同様の傾向であった。CHO-Bvcz 細胞の細胞内 HC₂ 濃度は CHX 添加後に一時的に増加しており、これは HcD6-B2A-A11 や HcD6-P1A-B02 細胞でも類似した現象が確認されている。HcD6-B2A-A11 や HcD6-P1A-B02 細胞と同様に、CHO-Bvcz 細胞でも CHX 添加後暫くの間、HC から HC₂ へのアセンブリが進行したと考えられる。また、BFA 添加後の CHO-Bvcz 細胞の細胞内 IgG 濃度も HcD6-B2A-A11 や HcD6-P1A-B02 と類似して、緩やかに増加し、細胞内への IgG の蓄積は限定的であった。従って、CHO-Bvcz 細胞の分泌プロセスにおけるボトルネックはフォールディングであると推測された。

KD 細胞を用いて得られた分泌プロファイルを活用した、CHO-Ritx, CHO-Iflx, CHO-Bvcz 細胞の小胞体に関連する分泌プロセスにおけるボトルネックの推定の妥当性を検証するために、各プロセスを担う遺伝子を過剰発現させて抗体の比生産速度への影響を評価した (図 22、23、24)。上述のとおり、CHO-Ritx 細胞は分泌プロセスにおける確たるボトルネックを有していないことが予測され、むしろ LC などの mRNA 発現量増加など、ポリペプチドのさらなる供給が抗体の比生産速度を増加させると考えられる。CHO-Ritx 細胞由来の過剰発現細胞は回分培養期間中にコントロールと同様の IgG 濃度を示し、対数増殖期における比生産速度はコントロールよりも 0.720-20.3%低かった。これは分泌プロセスに大きなボトルネックを有していない可能性が高いという推定と一致していた。LC の mRNA 発現量の増加をはじめとする LC のポリペプチドの供給量の増加が抗体の比生産速度を改善するかどうかを明らかにするにはさらなる調査が必要である。CHO-Iflx 細胞の分

泌プロセスのボトルネックは、LC 内のジスルフィド結合形成のエラーに起因するフォールディングやアセンブリにあると推定された。CHO-Iflx 細胞由来の過剰発現株はコントロールの Iflx-Mock 細胞より低い抗体濃度と比生産速度を示した。先行研究により Infliximab 生産 CHO 細胞では UPR に関する ERAD 経路がアップレギュレートされていることが報告されており⁷³、Infliximab の発現は LC 内のジスルフィド結合形成のエラーにより正しく折りたたまれていない LC によって小胞体ストレスを引き起こすと考えられる。タンパク質の過剰発現は小胞体ストレスを引き起こし、抗体の生産性を制限することが報告されている¹²⁶。CHO-Iflx 細胞での分泌プロセスに関連するタンパク質の過剰発現はさらなる小胞体ストレスを引き起こしている可能性があり、抗体の比生産速度が減少したと考えられる。しかしながら、Iflx-PDI 細胞が過剰発現細胞の中で最も高い比生産速度を示した。PDI の過剰発現は LC 内のジスルフィド結合の形成を部分的に支援したが可能性がある。一方で、CHO-Iflx 細胞では誤って処理されたシグナルペプチドが LC のミスフォールディングを引き起こしている可能性が高く、PDI の過剰発現の影響は限定的であったと考えられる。先行研究でも検証されているように、シグナルペプチドを処理するシグナルペプチダーゼやシグナル認識粒子 (signal recognition particle, SRP) が CHO-Iflx 細胞のボトルネックを直接的に解消できると考えられる⁷²。CHO-Bvcz 細胞の分泌プロセスにおけるボトルネックはフォールディングであると推定された。推定の通り、フォールディングに関わる PPIase の過剰発現は CHO-Bvcz 細胞の抗体の比生産速度を 18.9%増加させた。しかしながら、フォールディングに関わる BiP の過剰発現による比生産速度の増加は確認されなかった。BiP の過剰発現はフォールディングを支援することで小胞体ストレスを軽減するが、抗体が小胞体内での滞留時間が増加することが報告されている¹²⁷。従って、CHO-Bvcz 細胞における BiP の過剰発現はフォールディングを部分的に支援したが、抗体の小胞体における滞留時間は長くなり、最終的に抗体の比生産速度はほとんど変化がなかったと考えられる。興味深いことに、Sar1A の過剰発現も CHO-Bvcz 細胞の抗体の比生産速度を 22.3%増加させた。BFA 添加アッセイの細胞内 IgG 濃度に着目すると、CHO-Bvcz 細胞における IgG の初期濃度はすべての細胞の中で Sar1A をノックダウンした HcD6-S2A-A10 細胞に次いで 2 番目に高かった。従って、フォールディングのみならず、小胞輸送も CHO-Bvcz 細胞の分泌プロセスにおけるボトルネックの一つであったことが示唆された。以上の検証より、分泌プロファイルを用いた 3 種類の抗体生産 CHO 細胞のボトルネックの推定は妥当であると結論付けられた。

本章では、抗体生産 CHO 細胞の小胞体に関連する分泌プロセスにおけるボトルネックが細胞の抗体生産、特に細胞内の抗体動態に与える影響を人工的に分泌プロセスにボトルネックを生じさせることで体系的に評価した。分泌プロセスにノックダウンを生じさせた細胞の分泌プロセスを翻訳阻害剤や小胞輸送阻害剤を用いて解析し、そこで得られた分泌プロファイルを活用することで 3 種類の異なる抗体生産 CHO 細胞の分泌プロセスに

におけるボトルネックを推定した。推定の妥当性を検証し、妥当であることが明らかとなった。ここで得られた知見を用いることで、抗体生産 CHO 細胞の分泌プロセスにおけるボトルネックを簡易的にスクリーニングできる可能性がある。一方で、抗体の比生産速度を劇的に改善するような因子の特定には潜在的な限界がある。このアプローチはこれまで実施されてきたような地道で詳細な解析と組み合わせることで、相乗効果が期待できる。また、本章では異なる細胞に対してではあるものの、関連遺伝子のノックダウンにより分泌プロセスにボトルネックを生じさせ、反対に関連遺伝子の過剰発現によって推定されたボトルネックの改善を試みている。分泌プロセスにほとんどボトルネックのない場合は任意のプロセスを担う遺伝子の発現量を低下させることでそこが分泌プロセス全体におけるボトルネックとなると考えられる。すでに特定のボトルネックが存在している場合はそのプロセスを担う遺伝子のノックダウンによってさらにボトルネックが深刻化することで抗体の比生産速度は減少し、反対に関連遺伝子の過剰発現によってボトルネックは緩和し、抗体の比生産速度は増加すると考えられる。また、ボトルネックが複数存在する場合は単一のプロセスの改善では抗体の比生産速度の増加に繋がらない可能性が高いと考えられる。本章にて阻害剤を用いたアッセイで細胞内抗体や中間体の濃度変化に大きな違いが KD 細胞間で生じたこと、そして KD 細胞間で抗体の比生産速度への影響が異なっていたことは、関連遺伝子のノックダウンによって人工的に異なる分泌プロセスにボトルネックを生じさせることに成功していることを裏付けている。さらに、推定の妥当性の検証にて単一の遺伝子の過剰発現が大幅な抗体の比生産速度の改善に繋がらなかったことは、分泌プロセスの主要なボトルネックは単一のプロセスのみならず複数のプロセスかつ、今回対象とした4つのプロセス以外のプロセスで生じていることを示唆している。

第四章 新規抗体生産宿主 CHL-YN 細胞の分泌プロセスに関する網羅的解析

4.1 序章

トランスクリプトミクスやプロテオミクス、メタボロミクスを始めとするオミクスプロファイリングは CHO 細胞の全体像の理解に大きく貢献してきた¹²⁸⁻¹³³。CHO 細胞培養における培養液中の酸素濃度や pH などのプロセスパラメータの変化が細胞増殖や生産性、そして生産物の品質に影響を与える際にその背景で起こっているメカニズムとしての生物学的プロセスや経路における変化をオミクスプロファイリングは明らかにしている^{134,135}。特に、異なる CHO 細胞株間の比較や、由来となる生物種、または自然界でのもとの役割が異なる細胞間での比較においてオミクスプロファイリングを用いた GO エンリッチメント解析やパスウェイエンリッチメント解析はその威力を発揮する。CHO-K1 や CHO-DG44, CHO-DXB11 という異なる CHO 細胞株間でのオミクスプロファイルの比較はエネルギー代謝や細胞周期に関する細胞内プロセスが細胞間で異なっていることを明らかにした¹³⁶。本章では、新規に樹立されたバイオ医薬品生産宿主である CHL-YN 細胞と CHO 細胞のトランスクリプトームやプロテオームをバイオリジカルプロセスとパスウェイのエンリッチメント解析によって比較した。CHO 細胞と CHL-YN 細胞のトランスクリプトームプロファイルと比較すると、CHL-YN 細胞ではアミノ酸や塩基、脂質の代謝やタンパク質の翻訳プロセスが、CHO 細胞では小胞体における翻訳後プロセスが活性化されていた。CHO 細胞と CHL-YN 細胞のプロテオームの比較では、トランスクリプトミクスと一貫して CHL-YN 細胞ではエネルギー生産やバイオマス生産、そして細胞周期に関連するプロセスが、CHO 細胞では小胞輸送などの翻訳後プロセスが活性化していた。ここで得られた発見は新規のバイオ医薬品生産宿主として有望な CHL-YN 細胞の分泌プロセスを始めとする生産宿主としての特徴を明らかにし、従来の CHO 細胞や CHL-YN 細胞などの新規の宿主細胞の抗体生産性や増殖速度を左右する有効なバイオマーカーやセルエンジニアリングにおけるターゲットの探索に貢献する。

4.2 実験材料および実験方法

4.2.1 細胞培養

本章で使用した IgG₁ 生産 CHO-K1 細胞と IgG₁ 生産 CHL-YN 細胞はそれぞれ CHO-HcD6 細胞 (RRID: CVCL_9Y69)⁸⁶ と in-house の CHL-YN-IgG1 B-08 cell clone⁵⁶ であり、本章では CHO-K1-IgG と CHL-IgG と表記する。これらの細胞および CHO-K1 細胞 (ATCC:CCL-61) と CHL-YN 細胞⁵⁵ は 6 mM L-glutamine を添加した EX-CELL CD CHO Fusion (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) で培養した。なお、CHL-YN 細胞は以降 CHL 細胞と記載する。CHO-DG44 細胞は 6 mM L-glutamine を添加した EX-CELL 302 Serum-Free Medium for CHO Cells (Sigma Aldrich) で培養され、CHO-S 細胞 (R80007, Thermo Fisher Scientific) は 6 mM L-glutamine を添加した FreeStyl CHO Expression Medium (Thermo Fisher Scientific) で培養した。回分培養は 125 mL Erlenmeyer shake flasks を

用いて 30 mL の培養液量で、37°C、5% CO₂、湿度 80%、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-S は 90 rpm、CHO-K1-IgG、CHL、CHL-IgG は 140 rpm で、Climo-Shaker ISF1-XC によって実施した。毎日サンプリングを行い、VCC および Viability は Vi-CELL Cell Viability Analyzer によって測定した。CHO-K1-IgG、CHO-K1、CHO-DG44 は対数増殖期の後半である培養 4 日目に、CHL-IgG、CHL、CHO-S は対数増殖期の後半である培養 2 日目に 3×10^5 から 5×10^5 細胞を回収し、すべての細胞の細胞ペレットを RNA シーケンシング(RNA sequencing, RNA-seq)に用い、また、それぞれ同じタイミングで取得した CHO-K1-IgG と CHL-IgG の細胞ペレットはプロテオミクスに用いた。

4.2.2 細胞内転写物の RNA-seq

細胞ペレットからの mRNA の抽出は RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD)を用いて実施し、RNA ライブラリーの品質は Agilent 4200 TapeStation System (Agilent Technologies)を用いて確認した。RNA-seq library は TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina, San Diego, CA)を用いて調整し、RNA-seq は 101 bp、pair-end read で NovaSeq X (Illumina)を用いて実施した。

4.2.3 RNA-seq のデータプロセッシング

RNA-seq の生データは Fastp v0.22.0¹³⁷ を用いてアダプター配列をトリミングし、低品質配列をフィルタリングした。トリミング後の配列の品質は FastQC v0.12.1 を用いて確認した。トリミング後の配列はチャイニーズハムスターのトランスクリプトームデータベース GCF_003668045.3_CriGri-PICRH-1.0_rna.fna.gz 上に Salmon v1.10.0¹³⁸ を用いてマッピングされ、transcripts per million (TPM)のデータセットを取得した。CHO-K1 と CHL 間、CHO-DG44 と CHL 間、CHO-S と CHL 間、そして、CHO-K1-IgG と CHL-IgG 間の DEG を TPM データセットおよび R studio-driven TCC-GUI¹³⁹ を用いて取得した。TCC で使用したパラメータは filter low count genes threshold が 10、normalization および DEG identification methods が deseq2、そして、false discovery rate (FDR)<0.05 とした。CHO-K1 と CHL 間、CHO-DG44 と CHL 間、CHO-S と CHL 間、そして、CHO-K1-IgG と CHL-IgG 間の DEG に共通する DEG および、CHO-K1-IgG と CHL-IgG 間の DEG を用いて GO エンリッチメント解析と KEGG パスウェイエンリッチメント解析を行った。

4.2.4 細胞内タンパク質の質量分析

細胞ペレットは 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Thermo Fisher Scientific) を添加した RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific)により溶解した。ライセートは氷上で超音波破碎し、細胞由来のデブリは 4°C で遠心分離によって除去した。抽出された総タンパク質濃度は Pierce BCA Protein Assay Kit によって定量され、50 µg のタンパク質が乾燥され、50 µL の 50 mM triethylammonium bicarbonate (TEAB)で再懸濁した。12 µL

の 15 mg mL⁻¹ dithiothreitol (DTT)/100 mM TEAB を加え、58°C で 1 時間インキュベートし、タンパク質を還元した。1.2 µL の 36 mg mL⁻¹ iodoacetamide/100 mM TEAB を添加し、暗所で 30 分間インキュベートし、タンパク質をアルキル化した。タンパク質の精製は SP3 beads (PreOmics, Planegg, Germany)を用いて実施し、タンパク質のトリプシン消化は SP3 beads 上で行い、100 µL の 27 µg mL⁻¹ trypsin (Thermo Fisher Scientific)/100 mM TEAB を用いて、37°C、1000 rpm でオーバーナイトでインキュベートした。消化されたペプチドは TMT10plex Isobaric Label Reagents and Kits (Thermo Fisher Scientific)/42 µL acetonitrile を用いて tandem mass tag (TMT)でラベリングした。TMT でそれぞれラベリングされたサンプルを混合し、Pierce Det removal columns (Thermo Fisher Scientific)で精製し、標準的な reverse-phase liquid chromatography (RPLC) によって 24 フラクションに分画した後、LC-MS/MS に使用した。

分画した 24 フラクションはそれぞれ 50 µL の 2% acetonitrile/0.1% formic acid で再懸濁され、各フラクションあたり 3 µL を用いて、nano-LC-Orbitrap-Lumos (Thermo Fisher Scientific)によって解析を行った。ペプチドは 75 µm x 150 mm ProntoSIL-120-5-C18 H column 3 µm, 120 Å (BISCHOFF, Turvey, UK) および、NEO nano-LC (Thermo Fisher Scientific)を用いた RPLC によって分離し、solvent A (0.1% formic acid/2% acetonitrile)に対する solvent B (0.1% formic acid/90% acetonitrile)の割合を 90 分かけて線形に増加させることで溶出した。溶出されたペプチドは 1 µm emitter tip を用いて、1.9 kV spray voltage で Orbitrap Fusion Lumos mass spectrometer (New Objective, Littleton, MA)にスプレーされ、イオン化した。Dynamic exclusion 45 秒で Data Dependent Top 15 method により Orbitrap で 400-1500 m/z の範囲で Full MS survey scans を実施した。各プリカーサーイオンは 0.7 Da の範囲で単離され、HCD activation collision energy 38 でフラグメント化された。プリカーサーイオンおよびフラグメントイオンはそれぞれ分解能 120,000 および、50,000 で解析した。

4.2.5 プロテオームのデータプロセッシング

ペプチド配列は MS および MS/MS スペクトルから同位体分離された質量を基に、Proteome Discoverer 3.2.5 (Thermo Fisher Scientific) および Mascot 2.8.2 (Matrix Sciences, Chicago, IL)を用いて、*Cricetulus griseus* protein database に基づいて同定した。システインにおける carbamidomethyl、N 末端における TMT6pl、リシンにおける TMT6pl は固定修飾として設定し、メチオニンの酸化およびアスパラギンとグルタミンの脱アミド化は可変修飾として設定した。プリカーサーイオンおよびプロダクトイオンの質量許容差はそれぞれ 5 ppm および 10 ppm とした。各サンプルの同定したタンパク質量は総ペプチド量で補正した。NCBI の *Cricetulus griseus* database を用いたアノテーションで、低品質なアノテーションを示したタンパク質は解析から除外した。FDR<0.01、Mascot Score>40、そして全てのサンプルで検出されたタンパク質を信頼可能なタンパク

質として解析に用いた。One-way analysis of variance (ANOVA)において、CHO-K1-IgG と CHL-IgG 間で $p < 0.05$ のタンパク質を DEG とした。

4.2.6 GO/KEGG パスウェイエンリッチメント解析によるトランスクリプトミクス

ノンコーディング RNA および NCBI *Cricetulus griseus* database を用いたアノテーションにおいて“LOC”から始まる、機能が未確定であり、低信頼性の遺伝子にアノテーションされた mRNA は DEG から除外した。DEG の中で 2 倍以上の発現量差を示した DEG に関して、mRNA アクセションナンバーに基づいて NCBI *Cricetulus griseus* database により gene symbol を取得した。最終的に取得した DEG を用いて、gene symbol に基づいて GO エンリッチメント解析、Kyoto Encyclopedia Genes and Genome (KEGG)¹⁴⁰ パスウェイエンリッチメント解析を行った。

GO エンリッチメント解析は Metascape (<https://metascape.org>)¹⁴¹ を用いて、biological process に関して実施した。Metascape で使用した解析条件は、ontology source は GO Biological Processes、enrichment background は *Mus musculus* genome の全遺伝子とした。Collection および grouping の閾値は、cumulative hypergeometric distribution を $p < 0.01$ とし、minimum count を 3、enrichment factor を 1.5 以上とした。有意にエンリッチされたタームは Benjamini-Hochberg (BH) corrected FDR¹⁴² で $q < 0.1$ の閾値で決定した。

KEGG パスウェイエンリッチメント解析は Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) (<http://www.david.niaid.nih.gov>)¹⁴³ を用いて実施した。DAVID による KEGG パスウェイエンリッチメント解析で使用した解析条件は、annotation category を KEGG_PATHWAY、enrichment background を *Cricetulus griseus* genome の全遺伝子とした。Collection と grouping の閾値は、modified Fisher's exact p-value である EASE Score¹⁴⁴ を $p\text{-value} < 0.01$ 、minimum count を 2 とした。有意にエンリッチされたタームは Benjamini-Hochberg (BH) corrected FDR で $q < 0.1$ の閾値で決定した。

4.2.7 GO/KEGG パスウェイエンリッチメント解析によるプロテオミクス

NCBI *Cricetulus griseus* database を用いたアノテーションにおいて低品質アノテーションを示したタンパク質は DEG から除外した。DEG の中で 1.2 倍以上の発現量差を示した DEG を用いて、それぞれの gene symbol に基づいて、GO エンリッチメント解析および KEGG パスウェイエンリッチメント解析を実施した。両解析において使用された解析条件はトランスクリプトミクスと同じである。

4.2.8 mRNA およびタンパク質発現量の比較

TPM データ及びタンパク質の定量データを用いて mRNA およびタンパク質発現

量の比較を行った。各 mRNA およびタンパク質には配列のバリエーションが存在するが、最も豊富に存在するバリエーションを発現量の比較に用いた。特定のパスウェイやバイオリジカルプロセスに該当する遺伝子リストは KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) の *Cricetulus griseus* のデータベースおよび、AmiGO (<http://www.geneontology.org>)¹⁴⁵ の *Mus musculus* のデータベースより取得した。ER to Golgi vesicle-mediated transport および、Golgi to plasma membrane protein transport のバイオリジカルプロセスに該当する遺伝子リストは GO:0006888 および、GO:0043001 を参照した。

4.3 結果

4.3.1 CHL-YN 細胞と CHO 細胞のトランスクリプトミクスの比較

CHO-K1 と CHL、CHO-DG44 と CHL、CHO-S と CHL、そして、CHO-K1-IgG と CHL-IgG、すべてのペアに共通する 767 個の DEG から、2 倍より大きい発現量差を示すすべてのペア間で示す DEG を選択し、そのうち CHL と CHL-IgG を含む CHL 細胞グループで高発現量を示す DEG と、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-S、CHO-K1-IgG を含む CHO 細胞グループで高発現量を示す DEG をそれぞれ用いて GO エンリッチメント解析を行った。CHL 細胞のグループでは amino acid metabolic process や dicarboxylic acid metabolic process, positive regulation of organic acid transport など、有機酸代謝に関わるバイオリジカルプロセスがアップレギュレートされていた (図 25A)。代謝に関わるプロセスは有機酸代謝のみならず、核酸塩基に関する代謝や脂質に関する代謝もアップレギュレートされていた。その他の抗体生産に重要なプロセスとして、翻訳に関わるプロセスやミトコンドリアに関わるプロセスもアップレギュレートしていた。CHO 細胞のグループでは、細胞骨格や組織構造の維持に関わるプロセスが多くアップレギュレートしていた (図 25B)。抗体生産に大きく関わるプロセスとして secretion がアップレギュレートしていたのが特徴であった。抗体生産クローン間の 3966 個の DEG のうち、2 倍より大きい発現量差を示す mRNA を選択し、その中で CHL-IgG 細胞で高発現量を示す mRNA と CHO-K1-IgG 細胞で高発現量を示す mRNA を用い同様に GO エンリッチメント解析を行った。抗体生産クローン間の比較でも同様に、CHL-IgG 細胞では有機酸や核酸塩基、脂質に関する代謝に関わるプロセスがアップレギュレートしていた (図 25C)。特に、regulation of translation や ribosome assembly など翻訳に関わるプロセスがより強く機能していることがわかった。CHO-K1-IgG 細胞では親細胞も含めた全体の比較と異なり、secretion に関わるプロセスがエンリッチされたタームとして上位 20 に入らなかった (図 25D)。また、細胞骨格や組織構造の維持に関わるプロセスがより強く機能していることがわかった。

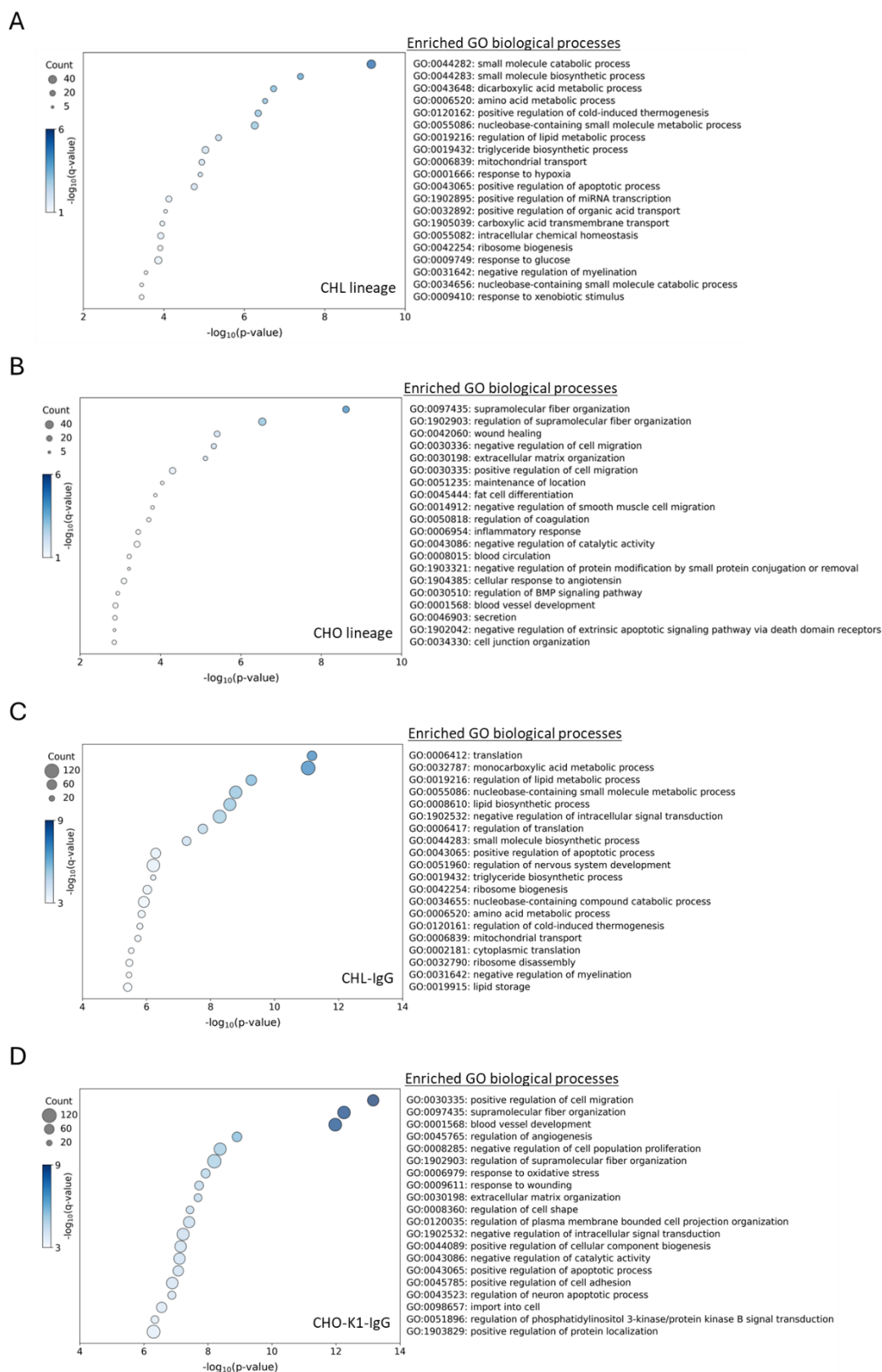


図 25 GO エンリッチメント解析によるトランスクリプトミクス

(A) CHL 細胞グループ、(B) CHO 細胞グループ、(C) CHL-IgG、(D) CHO-K1-IgG で有意にエンリッチメントされていた上位 20 のバイオロジカルプロセスの GO ターム。これらの図は Tsunoda, Y., *et al.* (2025). *Sci. Rep.* **15**, 39784.にて公開されている。(プロットの大きさは解析に用いた DEG リストの中で、各タームに該当する遺伝子の数を表す。)

KEGG パスウェイエンリッチメント解析は GO エンリッチメント解析に用いた mRNA リストを用いて実施した。すべてのペア間での比較では、CHL 細胞のグループでは cysteine and methionine metabolism や arginine and proline metabolism などアミノ酸の代謝に関するパスウェイがエンリッチされていた (図 26A)。脂肪代謝に関わる PPAR signaling pathway や fatty acid metabolism など GO エンリッチメント解析と一貫して脂肪代謝に関わるパスウェイがアップレギュレートされていた。また、エネルギー生産の中心を担う TCA cycle がアップレギュレートされていた。CHO 細胞のグループでは、設定した q 値の基準を超えたパスウェイは 1 つしかなく、それは sheer stress に関わるパスウェイであった (図 26B)。抗体生産クローン間の比較では、CHL-IgG 細胞では biosynthesis of amino acid や脂肪代謝に関わるパスウェイ、TCA cycle が親細胞も含めた比較と一貫してアップレギュレートされていた (図 26C)。細胞増殖に関わる MAPK signaling pathway は CHL-IgG 細胞でのみアップレギュレートされていた。CHO-K1-IgG 細胞では、抗体生産に大きく関わるパスウェイとして protein processing in endoplasmic reticulum がアップレギュレートされていた (図 26D)。Lysosome が最もエンリッチされており、上述の GO enrichment analysis と一貫して、タンパク質の翻訳後のパスウェイがより機能していることが明らかになった。また、抗体の医薬品としての品質に重要な糖鎖修飾に関するパスウェイもアップレギュレートされていた。

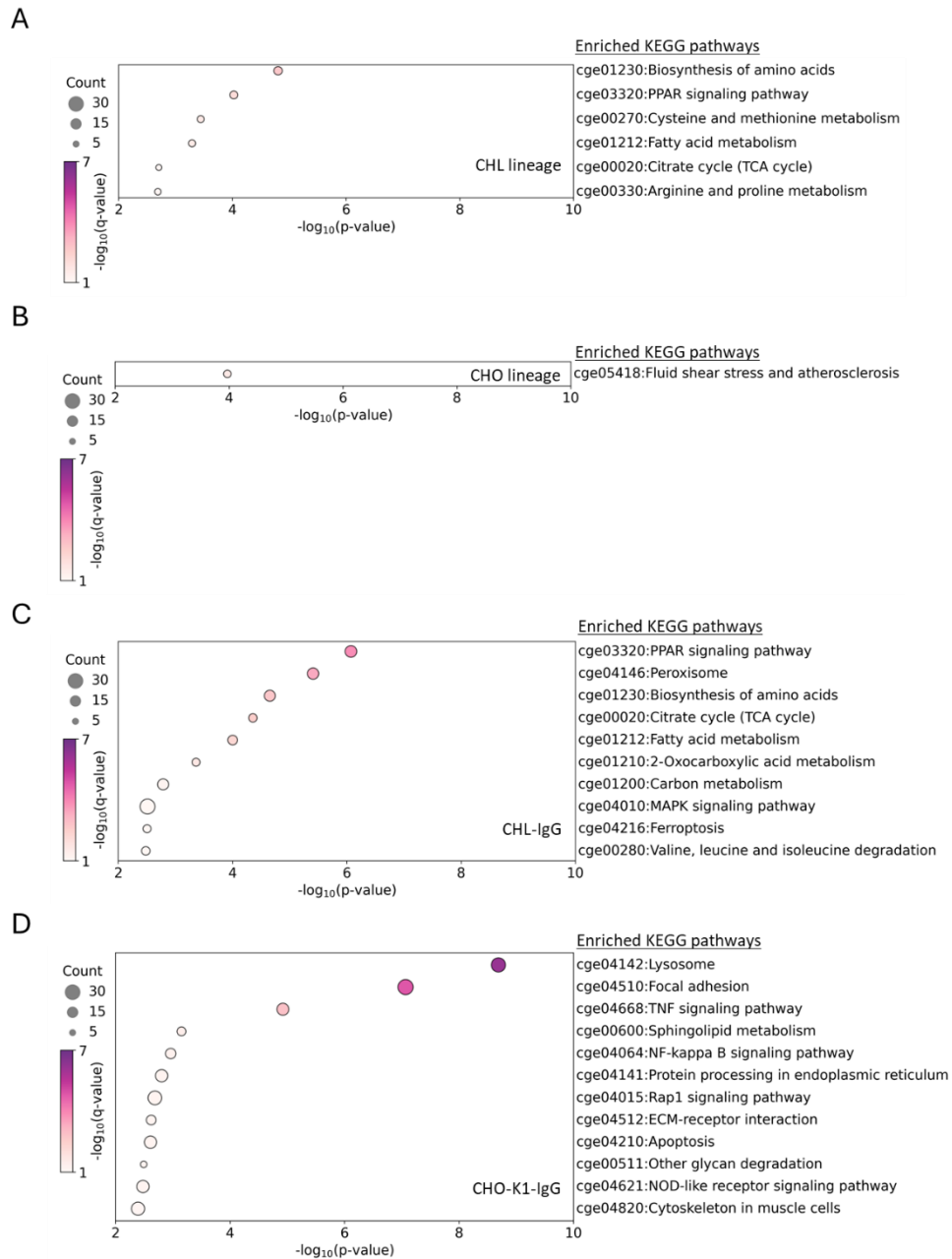


図 26 KEGG パスウェイエンリッチメント解析によるトランスクリプトミクス

(A) CHL 細胞グループ、(B) CHO 細胞グループ、(C) CHL-IgG、(D) CHO-K1-IgG で有意にエンリッチメントされていた上位 20 の KEGG パスウェイのターム。これらの図は Tsunoda, Y., *et al.* (2025). *Sci. Rep.* **15**, 39784.にて公開されている。(プロットの大きさは解析に用いた DEG リストの中で、各タームに該当する遺伝子の数を表す。)

4.3.2 CHL-YN細胞とCHO細胞のプロテオミクスの比較

CHO-K1-IgG細胞とCHL-IgG細胞間のDEGの中で1.2倍より大きい発現量差を示すタンパク質を選択し、CHL-IgG細胞で高発現量を示すタンパク質のリストとCHO-K1-IgG細胞で高発現量を示すタンパク質のリストを用いてGOエンリッチメント解析とKEGGパスウェイエンリッチメント解析を実施した。CHL-IgG細胞でエンリッチされた上位20のタームのうち、13のタームが翻訳に関与するバイオロジカルプロセスであった(図27A)。トランスクリプトームに関するGOエンリッチメント解析でもCHL-IgG細胞で翻訳に関わるプロセスが複数個エンリッチされていたが、タンパク質レベルではより一層強くエンリッチされていた。ミトコンドリアに関わるプロセスや核酸塩基の代謝もトランスクリプトミクスと一貫してCHL-IgG細胞でアップレギュレートされていた。しかしながらトランスクリプトミクスとは異なり、細胞周期に関わる *chromosome organization* や *DNA replication* がタンパク質レベルではアップレギュレートされていた。CHO-K1-IgGでは抗体の分泌に直接関わる小胞輸送に関わるプロセスが上位20のエンリッチされたタームのうち4つを占めていた(図27B)。また、エンドサイトーシスやオートファジーに関わるプロセスもCHO-K1-IgG細胞ではアップレギュレートされていて、トランスクリプトミクスと同様に、タンパク質の翻訳後のプロセスがより強く機能していることが明らかとなった。

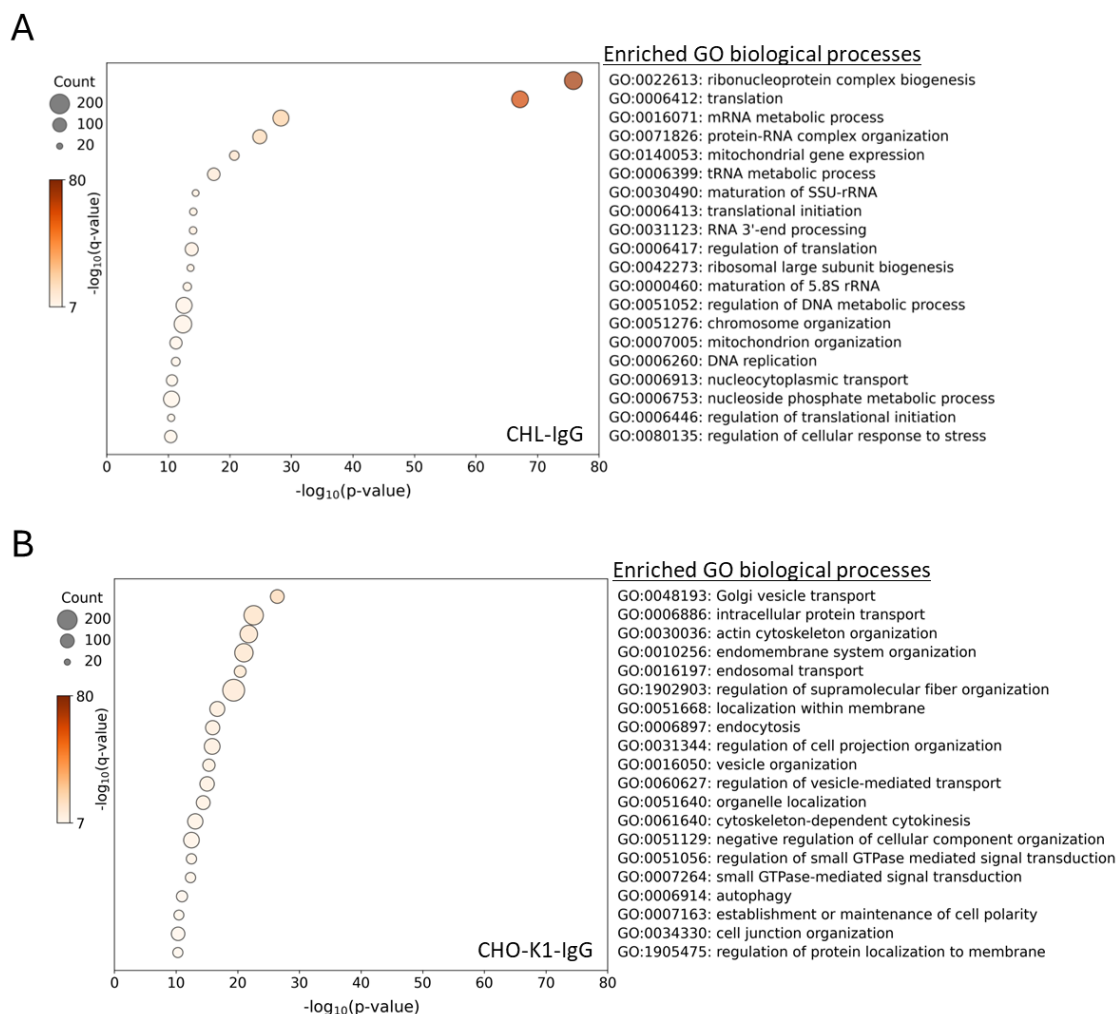


図 27 GO エンリッチメント解析によるプロテオミクス

(A) CHL 細胞グループ、(B) CHO 細胞グループ、(C) CHL-IgG、(D) CHO-K1-IgG で有意にエンリッチメントされていた上位 20 のバイオロジカルプロセスの GO ターム。これらの図は Tsunoda, Y., *et al.* (2025). *Sci. Rep.* **15**, 39784.にて公開されている。(プロットの大きさは解析に用いた DEG リストの中で、各タームに該当する遺伝子の数を表す。)

KEGG パスウェイエンリッチメント解析は GO エンリッチメント解析に用いたタンパク質リストを用いて実施した。CHL-IgG 細胞ではトランスクリプトミクスと同様に、Fatty acid metabolism と PPAR signaling pathway がアップレギュレートされており、タンパク質レベルでも脂肪代謝に関わるパスウェイがアップレギュレートされていることがわかった (図 28A)。エンリッチされた 14 タームの中で翻訳に関するパスウェイは 7 つあり、トランスクリプトーム やプロテオームを用いた GO エンリッチメント解析と一貫して、

CHL-IgG 細胞では翻訳に関するパスウェイが強く機能していることが明らかとなった。タンパク質レベルでは mismatch repair や DNA replication がなど、細胞周期に関わるタームが 14 タームのうち 4 ターム含まれていた。一方、CHO-K1-IgG 細胞では、トランスクリプトームを用いた KEGG パスウェイエンリッチメント解析と同様に、endocytosis、lysosome、protein processing in endoplasmic reticulum がアップレギュレートされており、タンパク質翻訳後のパスウェイが一貫して高度に制御されていることがわかった（図 28B）。上位 20 のエンリッチされたタームのうち、sphingolipid signaling pathway や glycerolipid metabolism など、脂質に関する代謝経路やシグナル伝達経路が 4 ターム、核酸塩基代謝に関わるパスウェイが 2 ターム含まれており、脂質と核酸塩基の代謝はすべてが CHO-K1-IgG 細胞よりも CHL-IgG 細胞でアップレギュレートされているわけではないことが明らかとなった。また、抗体の CDC 活性に影響を与えるガラクトースの代謝経路など、糖代謝のパスウェイが 3 つ CHO-K1-IgG 細胞においてエンリッチされていた。

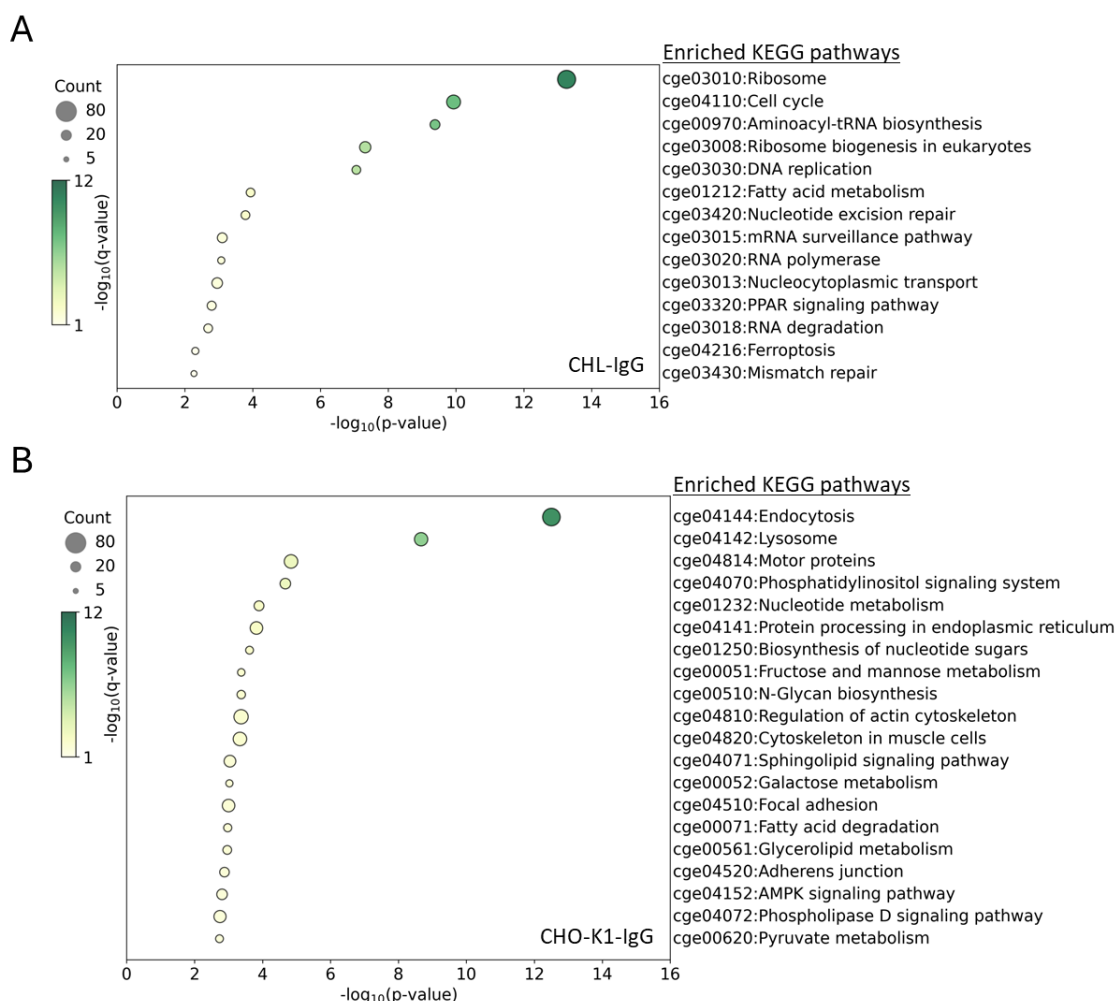


図 28 KEGG パスウェイエンリッチメント解析によるプロテオミクス

(A) CHL 細胞グループ、(B) CHO 細胞グループ、(C) CHL-IgG、(D) CHO-K1-IgG

で有意にエンリッチメントされていた上位 20 の KEGG パスウェイのターム。これらの図は Tsunoda, Y., *et al.* (2025). *Sci. Rep.* **15**, 39784.にて公開されている。

(プロットの大きさは解析に用いた DEG リストの中で、各タームに該当する遺伝子の数を表す。)

4.3.3 各細胞の特徴的なプロセス及びパスウェイの遺伝子発現量の比較

GO エンリッチメント解析や KEGG パスウェイエンリッチメント解析において CHL-IgG 細胞と CHO-K1-IgG 細胞それぞれで特徴的であったバイオロジカルプロセスやパスウェイを担う遺伝子の mRNA とタンパク質の発現量を比較した。CHL-IgG 細胞では、有機酸代謝や細胞周期に関わるパスウェイがアップレギュレートされていたため、これらのパスウェイの一部である biosynthesis of amino acid と DNA replication を担う遺伝子を CHL-IgG 細胞と CHO-K1-IgG 細胞間で比較した。比較を行った biosynthesis of amino acid を担う 16 の mRNA のうち、14 が、また、検出された 11 のタンパク質のうち、8 つが CHL-IgG 細胞で高発現であった (図 29A)。動物細胞培養用の CDM に含まれるアミノ酸の中で溶解性や安定性の低くさから、培地の配合や調整において課題のあるシステイン^{146,147}やグルタミンの生合成に必要な酵素、Cbs と Cth、glutamine synthetase である Glul が CHL-IgG 細胞で高い mRNA やタンパク質の発現量を示していた。Cbs, Cth, そして Glul の CHL-IgG 細胞での mRNA 発現量は CHO-K1-IgG 細胞の 2088, 510.3, 14.15 倍であった。DNA replication では 33 の遺伝子のうち、23 が mRNA で、タンパク質レベルでは検出された 26 のうち 18 個が CHL-IgG 細胞で高発現を示した (図 29B)。特に、3 種類の DNA polymerase である、DNA polymerase alpha-primase complex、DNA polymerase delta complex、DNA polymerase epsilon complex と、DNA 複製の開始と進行に関与するヘリカーゼ複合体である minichromosome maintenance complex (MCM complex)¹⁴⁸、DNA ポリメラーゼが鋳型 DNA を連続的に合成できるように DNA クランプを DNA に装着する Clamp loader¹⁴⁹に含まれる遺伝子の発現量が CHL-IgG 細胞で特に高かった。CHO-K1-IgG 細胞は CHL-IgG 細胞と比較して、抗体生産に関わるプロセスの中でも小胞輸送に関わるプロセスが特にアップレギュレートされていたため、ER to Golgi vesicle-mediated transport と Golgi to plasma membrane protein transport を担う遺伝子の発現量を比較した。ER to Golgi vesicle-mediated transport に関わる遺伝子リストからランダムに選択された 32 の遺伝子のうち、CHO-K1-IgG 細胞では 21 個、CHL-IgG 細胞では 6 個の遺伝子が mRNA とタンパク質どちらにおいても高発現であった (図 29C)。CHO-K1-IgG 細胞で高発現であった遺伝子のうち、タンパク質レベルで 2 倍以上の発現量差を示した Ero1b と Gosr1 は小胞体内でのジスルフィド結合形成を触媒する酸化還元酵素とゴルジ体での小胞膜融合に関与する soluble NSF attachment protein receptor (SNARE)タンパク質であった。Golgi to plasma membrane protein transport に関わる遺伝子リストからランダムに選択された 19 の遺伝子のうち 12 個が CHO-K1-IgG 細胞で mRNA とタンパク質

ともに高発現であり、CHL-IgG 細胞で mRNA とタンパク質ともに高発現だったものは微小管依存性の輸送過程を調節する GTPase である Arl3 のみであった (図 29D)。CHO-K1-IgG 細胞においてタンパク質レベルで 2 倍以上高発現であった遺伝子はエキソシスト複合体の一部で、細胞膜への小胞輸送と膜融合に関与する Exoc6 と、リソソームの位置調節やエンドサイトーシスに関与する GTPase である Rab34 であった。ER to Golgi vesicle-mediated transport と Golgi to plasma membrane protein transport に関わる遺伝子は mRNA とタンパク質のどちらにおいても 4 倍以上の発現量差を CHO-K1-IgG 細胞と CHL-IgG 細胞間で示すものではなく、全体的に CHO-K1-IgG 細胞において高発現であった。

4.4 考察

本章では、従来の CHO 細胞の約 2 倍の速さで増殖するチャイニーズハムスターの肺由来の CHL 細胞のトランスクリプトームプロファイルやプロテオームプロファイルをバイオインフォマティクス解析手法を用いて CHO 細胞と比較した。新規のバイオ医薬品生産宿主としての CHL 細胞の分泌プロセスをはじめとする抗体生産に大きく関わるバイオリジカルプロセスやパスウェイにおける CHO 細胞との違いを評価した。

CHO-K1、CHO-S、CHO-DG44 細胞と CHL 細胞間、また、CHO-K1-IgG 細胞と CHL-IgG 細胞間のすべてのペアに共通するトランスクリプトームにおける DEG および、CHO-K1-IgG 細胞と CHL-IgG 細胞間のトランスクリプトームレベルでの DEG を用いてバイオリジカルプロセスにおける GO エンリッチメント解析と KEGG パスウェイエンリッチメント解析を実施し、CHO 細胞と CHL 細胞間の包括的な比較と抗体生産株同士での比較を行った。すべてのペア間に共通する DEG を用いた解析でも抗体生産株間の DEG を用いた解析でも、バイオリジカルプロセスにおいて有機酸、核酸塩基、脂質に関する代謝が CHL 細胞のグループでアップレギュレートされていた。KEGG パスウェイエンリッチメント解析によってそれらは cysteine and methionine metabolism や arginine and proline metabolism、そして PPAR signaling pathway などがアップレギュレートされている具体的な経路として含んでいることがわかった。CHL 細胞と CHO 細胞の流加培養におけるメタボロミクスを比較した先行研究では、アルギニンとメチオニンの代謝経路内のオルニチンやプトレシン、シスタチオン、グルタチオンなどの代謝物の濃度の流加培養中の経時変化が大きく異なっており、さらにこれらの代謝経路に関連した遺伝子の発現が CHL 細胞で高かった。オルニチンはグルタミン酸の代謝にも関係しており、プトレシンはポリアミンの一つであり CHO-K1 細胞の成長補助サプリメントとして機能すると報告されている¹⁵⁰。また、細胞内グルタチオン濃度は CHO 細胞において抗体の比生産速度と相関することが報告されている^{85,151}。したがって、CHL 細胞におけるこれらのアミノ酸代謝経路のアップレギュレートはバイオ医薬品生産において CHO 細胞を上回る利点を提供する可能性がある。CHL 細胞では、TCA cycle やミトコンドリアに関連するプロセス、翻訳に関連するプロセスがアップレギュレートされていた。有機酸代謝や TCA cycle, そしてミトコンドリアに関わるプロセスはすべて細胞の活動に必要なエネルギーの生産に関わっており、また、脂質代謝や翻訳に関連するプロセスはバイオマス生産に関わっている。この CHL 細胞のエネルギーやバイオマス生産に関わるプロセスの強さが CHL 細胞の細胞増殖の速さに必要である可能性がある。CHO 細胞のグループではバイオリジカルプロセスにおける secretion や lysosome、protein processing in ER、糖代謝に関わるパスウェイがエンリッチされていた。CHL 細胞と比較して CHO 細胞は翻訳後のプロセスが特徴的にアップレギュレートされており、モノクローナル抗体などの組換えタンパク質を効率よく分泌する事ができる能力があることを示唆している。したがって、バイオ医薬品生産に用いる新たな

宿主細胞としての CHL 細胞の可能性を広げるために、これらの翻訳後プロセスを強化するためのセルエンジニアリングやクローニングの際に翻訳後プロセスが強い CHL 細胞を選択するためのバイオマーカーを今後研究することが重要である。

CHO-K1-IgG 細胞と CHL-IgG 細胞間のプロテオームの DEG を用いて、バイオリジカルプロセスにおける GO エンリッチメント解析と KEGG パスウェイエンリッチメント解析を実施し、CHO 細胞と CHL 細胞間のプロテオームプロファイルにおける違いを調査した。CHL-IgG 細胞では翻訳に関連するプロセスが GO エンリッチメント解析でも KEGG パスウェイエンリッチメント解析でも非常に高くアップレギュレートされていた。また CHL-IgG 細胞では DNA replication などの細胞周期に関わるプロセスがバイオリジカルプロセスとパスウェイの両方においてエンリッチされており、トランスクリプトミクスと一致してミトコンドリアに関わるプロセスもエンリッチされていた。細胞内の多くの活動の中心を担うタンパク質の翻訳に関連したプロセスの強さが、リボソームの生合成や mRNA のプロセッシング、翻訳に関連する因子の輸送を始めとする幅広い翻訳関連プロセスのアップレギュレートによって CHL-IgG 細胞において特徴づけられていた。CHO 細胞の遺伝子増幅システムは組換えタンパク質遺伝子の mRNA 発現を増加させ、それに伴い翻訳量と分泌量も増加する。しかし、これらは必ずしも線形的な関係ではなく、翻訳や翻訳後プロセスの効率に左右されることが報告されている^{152,153}。CHL 細胞は組換えタンパク質の発現において翻訳プロセスがボトルネックとならない可能性が CHO 細胞よりも高く、特に CHL-YN 細胞で課題なりうる分泌を必要としない膜タンパク質の生産に有利であるかもしれない (図 27、28)。それを検証するために、CHL 細胞の翻訳効率を CHO 細胞と比較することが重要である。細胞周期に関わるプロセスが従来の CHO 細胞より約 2 倍細胞増殖の早い CHL-IgG 細胞でアップレギュレートされていたのは興味深い。細胞周期に関わるプロセスの中でも DNA replication、mismatch repair や chromosome organization がエンリッチされており、CHL 細胞ではゲノムの複製やエラーの修正に関する機能が CHO 細胞よりも強い可能性がある。CHO 細胞の特徴の一つとしてゲノム不安定が高いことが挙げられるが、これはバイオ医薬品製造における細胞株構築やスケールアップなどのプロセス開発全体において、CHO 細胞の組換えタンパク質の生産効率や生産されたタンパク質の品質の不安定性につながることを報告されている¹⁵⁴⁻¹⁵⁶。したがって、CHL 細胞のゲノム不安定性についての理解を深めることは安定性の高い宿主細胞を開発することに繋がる可能性がある。CHO-K1-IgG 細胞では、バイオリジカルプロセスに関しては小胞輸送に関連したプロセスが特にエンリッチされていた。CHO 細胞の抗体生産において分泌プロセスを解析した先行研究では、アセンブリが完了した状態の抗体が小胞体に蓄積しており、小胞輸送が分泌プロセスにおける一つのボトルネックとなっていることが報告されている^{75,124}。第二章の研究を始めとする小胞体からゴルジ体への抗体の小胞輸送の改善を試みた研究では、IgG₁に結合している糖鎖修飾を認識し、小胞体からゴルジ体への輸送を担う COPII 小

胞に IgG₁ を組み込むレクチンタンパク質、ERGIC-53 や COPII 小胞の形成に関与する GTPase である Sar1A の過剰発現が CHO 細胞の抗体生産性を向上させた^{78,157}。したがって、CHO 細胞を用いた抗体の生産において、遺伝子増幅により大幅な抗体の生産性向上が容易に達成でき、日常的に 10 g L⁻¹ を超えるイールドや 20 pg cell⁻¹ day⁻¹ を超える比生産速度を達成できているのは CHO 細胞の潜在的な小胞輸送プロセスなどの分泌プロセスの強さに起因する可能性がある。CHO-K1-IgG 細胞のパスウェイでは細胞の抗体生産に直接関与する protein processing in ER や glycan metabolism に関連したパスウェイがアップレギュレートされていた。小胞体におけるタンパク質のプロセッシングにおいて、ジスルフィド結合の形成を担う PDI や合成されたペプチドを小胞体内へ誘導するシグナル受容体タンパク質、SRP14 の CHO 細胞での過剰発現がそれぞれフォールディング効率を改善し、小胞体内で抗体の軽鎖による凝集体ができることを防ぎ、いずれも抗体生産性を改善した^{72,158}。また、抗体に結合する N-結合型糖鎖修飾のガラクトシル化は治療用抗体の CDC 活性の向上に関わっている。したがって、抗体の生産性や品質を直接左右する protein processing in ER や glycan metabolism の CHO 細胞における優位性は CHO 細胞が主要な抗体医薬品の生産宿主である所以を改めて示した。

CHL-IgG 細胞で特徴的な biosynthesis of amino acid や DNA replication と CHO-K1-IgG 細胞で特徴的な ER to Golgi vesicle-mediated transport や Golgi to plasma membrane protein transport を担う遺伝子の発現量を mRNA とタンパク質で比較した。システインは抗酸化物質であるグルタチオンの前駆体であり、システイン不足は酸化ストレスを引き起こすため、バイオ医薬品生産における培養において重要な役割を果たす¹⁵⁹。しかしながら、システインは中性 pH の培地中での安定性と溶解性の低さからシステインダイマーを形成し、培地中で沈殿を生じる。このため、CHO 細胞において Cysteine 合成に関わる複数の酵素を過剰発現し、CHO 細胞にシステイン合成能力をもたせる試みが行われている¹⁴⁶。そのうちの 2 つの遺伝子、Cbs と Cth の mRNA 発現量が CHO-K1-IgG 細胞と比較して CHL-IgG 細胞で極めて高く、潜在的に培地組成におけるシステインの必要量を減らすことができる可能性がある。したがって、システインの必要量を減らすための十分な内因性のシステイン合成能力が CHL 細胞にあるのか、また、どれほど減らすことができるのかを調査することが重要である。タンパク質レベルでは検出できなかったが、Glul の mRNA 発現量は CHL-IgG 細胞で高く、グルタミンもシステインと同様に培地中で不安定なアミノ酸であり、特に温度に敏感であるため、37°C の培養条件下ではグルタミンはグルタミン酸とアンモニアに分解されることがある。Glul が高発現である CHL-IgG 細胞は培地を使用する直前での添加が必要なグルタミンを含まない培地で培養することができ、細胞培養のオペレーションをより簡素化できることが期待される。DNA replication に関連する遺伝子は全体的に CHL-IgG 細胞で高発現であった。細胞が速く増殖するためには正しく速くゲノムが複製される必要があり、GO エンリッチメント解

析や KEGG パスウェイエンリッチメント解析において CHL-IgG 細胞でエンリッチされていた mismatch repair や nucleotide excision repair、DNA replication に関わる遺伝子の高い発現量が CHL 細胞の高い増殖能を支えている一つの要因である可能性がある。しかしながら、バイオ医薬品生産に用いる哺乳類宿主細胞に対して mismatch repair や nucleotide excision repair、DNA replication におけるどの詳細なプロセスや単一の遺伝子が細胞増殖速度に関与しているのかに関する調査は限定的である。CHO-K1-IgG 細胞では ER to Golgi vesicle-mediated transport や Golgi to plasma membrane protein transport を担う遺伝子の発現量が CHL-IgG 細胞よりも全体的に高かった。CHO 細胞の小胞体からゴルジ体への経路は小胞体内でのプロセスも含め、数多くの研究により様々なボトルネックが指摘され、改善がなされている^{72,78,124,157,158}。したがって、CHL 細胞の分泌プロセスの強化には単一のプロセスを狙ったセルエンジニアリングよりも分泌プロセス全体を強化できるアプローチの方が効果的であると考えられる。分泌に特化した形質細胞への分化に関わる Blimp1 とその下流でシャペロンやその他の折りたたみに関連するタンパク質を活性化する Xbp1 を CHO 細胞で過剰発現し、分泌プロセス全体を形質細胞のように最適化するようなセルエンジニアリングが有効であると考えられる⁷¹。

本章を通じて、CHL-IgG 細胞と CHO-K1-IgG 細胞間で分泌プロセスや増殖に深く関係する可能性の高いプロセスの活性が特徴的に異なっていることが初めて明らかとなった。本博士論文の第四章として、本章が特に分泌プロセスにおける CHO 細胞と CHL 細胞の違いに関して強調している理由は、CHO 細胞に関して高生産株構築手法が確立されている転写や翻訳と異なり、分泌プロセスに関する高生産株構築手法は CHO 細胞でも生産物や細胞株で効果が異なっており、これは CHL-YN 細胞に関しても同様であると考えられるためである。従って、まずは網羅的解析によって CHL-YN 細胞の分泌プロセスに関する全体的な特徴を把握するところから始め、CHL-YN 細胞の分泌プロセスを CHO 細胞と比較した際に、どのプロセスがどれくらい異なっているのか、また、全く異なっているのか、局所的に異なっているのかを明らかにすることが CHL-YN の分泌プロセスに着目する第一歩として重要だと考えられる。また、CHO 細胞と CHL-YN 細胞の特徴的な傾向として、CHO 細胞では分泌プロセスが、CHL-YN 細胞では細胞増殖に関するプロセスが活性していた。先行研究によって、CHO 細胞の抗体生産と細胞増殖はある程度トレード・オフの関係であることが指摘されている¹⁶⁰。先行研究では、細胞増殖のフェーズに合わせて過剰発現させる遺伝子を切り替え、CHO 細胞を細胞増殖に向かう状態から抗体生産に向かう状態へと変化させることで高い細胞濃度と抗体の比生産速度を達成した¹⁶⁰。形質細胞の分化マーカーである Blimp1 は分泌プロセスを広範に強化することができるマスターレギュレーターであるが、分泌プロセスの強化と引き換えに細胞増殖を制限する⁷¹。従って、CHL-YN 細胞に関しても、最大の特徴である高い細胞の比生産速度を最大限に利用しつつ、同時に高い抗体の比生産速度を達成するために、VCC がピークに達するタイミングで

Blimp1を発現させ、細胞の活動を細胞増殖から抗体生産へと切り替えることが望ましいと考えられる。

本章における制限として、CHO 細胞用に開発された培地を用いて CHL-YN 細胞を培養し、データを取得している点がある。その理由として、CHL-YN 細胞の特徴として、CHO 細胞用に開発された培地でも従来の CHO 細胞の 2 倍速い増殖速度を達成できる点があり、最適な培地を開発せずとも既存の CHO 細胞用の培地が応用できるためである。CHL-YN 細胞を抗体生産宿主として用いる際、CHO 細胞用の培地が適応される可能性は十分にあるため、本章で得た結果はそのような培養条件下におけるオミクスプロファイリングとして CHO 細胞と比較した CHL-YN 細胞の全体像を示すものである。CHL-YN 細胞の網羅的特徴が培地や培養条件によってどれほど変化するのは今後、調査する必要がある、これにより条件依存的な特徴と非依存的な特徴が明らかとなり、その際の細胞増殖における変化と合わせて解析することで、CHL-YN 細胞の細胞増殖能の高さを決定する因子の同定により近づくことができると期待される。また、本章におけるデータの取得は全てフラスコ回分培養によって実施されたが、実際の生産ではバイオリアクターが用いられるため、バイオリアクターによる培養下での網羅的特徴や、回分培養だけでなく流加培養における網羅的特徴の解析も重要である。バイオリアクターで培養した際に考えられる CHL-YN 細胞の網羅的特徴における変化はシアストレスや低酸素状態に対するストレス応答経路に現れると考えられる。また、CHL-YN 細胞の回分培養と流加培養間の考えられる網羅的特徴の変化は、代謝経路における変化と想定され、CHL-YN 細胞の KEGG パスウェイ解析で特徴的であったアミノ酸の生合成やシステインやアルギニンの代謝に関する経路の活性がフィードの組成によって変化すると考えられる。

本章では、CHL 細胞と CHO 細胞のオミクスプロファイルを比較し、CHL 細胞ではエネルギーやバイオマス、細胞周期に関するプロセスが、CHO 細胞では小胞輸送をはじめとする翻訳後プロセスが活性しており、抗体生産宿主としての特徴が明確に分かれていることが示された。CHL 細胞は翻訳や細胞周期に関するプロセスや代謝経路に CHO 細胞とは異なるバイオ医薬品生産の宿主細胞としてのアドバンテージがあると考えられる。一方で、CHL 細胞は小胞体におけるプロセッシングや小胞輸送など、分泌プロセスにおいて改善の余地があると考えられる。従って、CHL 細胞の分泌プロセスを改善するためには特定のプロセッシングではなく、分泌プロセス全体をリプログラミングできるような形質細胞の分化マーカー等の過剰発現が有効であることが示唆された。

第五章 総括と今後の展望

5.1 本研究の総括

5.1.1 各章の総括

バイオ医薬品を代表する抗体医薬品はそのほとんどが CHO 細胞を生産宿主として製造されている。というのも CHO 細胞は抗体医薬品に必要な高度な翻訳後修飾が可能であり、大規模生産を可能にする細胞としての適性を有し、周辺技術も十分に確立されているためである。高生産株構築は遺伝子増幅法やホットスポットへのターゲットインテグレーションなど、さらには翻訳効率を高めるための抗体の塩基配列の最適化など、mRNA への転写やタンパク質への翻訳の増強を狙った技術によって支えられている。しかしながら、抗体医薬品は翻訳後修飾を含む、翻訳後の分泌プロセスを経て細胞外へ分泌される必要があり、特に小胞体やゴルジ体において複雑なプロセスを要する。これまで、CHO 細胞の分泌プロセスに関して多種多様なボトルネックが報告されており、従来型のモノクローナル抗体に加え、近年増加している高度に改変された抗体の生産はより一層分泌プロセスへの負荷を生ずると考えられる。また、新規の宿主細胞の樹立も急速に進んでおり、異種の抗体や細胞株横断的な分泌プロセスに関する基盤的知見の収集が堅牢な抗体医薬品生産プロセスの確立には必要不可欠である。本博士論文では、これまで報告されている小胞体への抗体の蓄積を改善する手法の開発、異種 IgG₁ 抗体の分泌プロセスにおけるボトルネックを推定する手法の開発、そして、従来の CHO 細胞の 2 倍の増殖速度を有する肺由来の新規宿主細胞、CHL-YN 細胞の分泌プロセスに着目した網羅的解析を実施した。

第二章では、先行研究でボトルネックであると指摘された小胞体における抗体の蓄積を解消するため、小胞体からゴルジ体への抗体輸送を担う COPII 小胞の形成に関わるタンパク質、Sar1A を CHO 細胞で過剰発現させ、抗体生産や分泌プロセスへの影響を解析した。Sar1A の過剰発現はプラスコ回分培養における抗体の比生産速度を 48.4%増加させ、細胞内の抗体の蓄積を 56.6%減少させた。蛍光免疫染色法および画像解析により、細胞内抗体のゴルジ体への局在化が確認され、Sar1A の過剰発現により抗体の小胞輸送が促進されたことが示唆された。また、Sar1A および、COPII 小胞へ抗体を組み込む ERGIC-53 の共局在を蛍光免疫染色法で同様に解析したところ、Sar1A 過剰発現株で顕著な共局在化が確認され、Sar1A が COPII 小胞の形成を促進していることが示唆された。Sar1A 過剰発現株では、懸念されたハイマンノース型の糖鎖修飾は検出されなかったものの、ガラクトースが結合した糖鎖修飾の割合はわずかながら減少しており、小胞輸送に関わる変化により、ゴルジ体への負担が増加したことが推測された。また、Sar1A の過剰発現はプラスコ回分培養の対数増殖期後に強く UPR を誘導することが確認されており、小胞体の恒常性に変化を与えることが示唆された。

第三章では、小胞体に関連する分泌プロセスのボトルネックは生産物や細胞株で異なり、現状、推定が困難であるという背景から、小胞体に関連する分泌プロセスであるフォールディングとアセンブリ、輸送タンパク質の選択、小胞輸送の 4 つのプロセスに人

工的にボトルネックを誘導した細胞株を用いて、各ボトルネックが抗体の比生産速度や細胞内抗体やその中間体の蓄積や分泌に与える影響を明らかにした。そして、得られた知見に基づき、3種類のIgG₁抗体生産株におけるボトルネックを推定した。4つのプロセスを担う5種類のタンパク質、BiP、PPIase、PDI、ERGIC-53、Sar1Aを発現の容易なTrastuzumabの生産株においてRNA干渉法によりノックダウンし、ボトルネックを人工的に誘導した5種類のKD細胞を構築した。回分培養における抗体の比生産速度とKDターゲット遺伝子の発現量の関係から、PDIのノックダウン、つまり、アセンブリにおけるボトルネックが特に比生産速度を減少させることが明らかとなった。小胞輸送阻害剤BFAや翻訳阻害剤CHXを用いて、ボトルネックが抗体や中間体の細胞内濃度の変化に与える影響を解析したところ、ボトルネックを誘導したプロセスによって特徴的な違いが確認された。小胞輸送におけるボトルネックは細胞内抗体の顕著な蓄積を引き起こし、BiPやPPIase、すなわち、フォールディングにボトルネックを有する細胞では細胞内抗体濃度の変化は限定的であった。RituximabとInfliximab、Bevacizumab生産株を用いて阻害剤添加実験を行い、KD細胞を用いて得られた分泌プロファイルを基に、ボトルネックを推定した。フォールディングにボトルネックがあると推定されたBevacizumab生産株はPPIaseの過剰発現により抗体の比生産速度が限定的であったものの18.9%増加し、推定はおおむね妥当であることが検証された。

第四章では、新規樹立されたCHL-YN細胞とCHO細胞株のオミクスプロファイルをもRNAおよびタンパク質レベルで比較し、分泌プロセス等の抗体生産に関わるプロセスやCHL-YN細胞の高増殖能に関与する経路を解析した。CHL-YN細胞では、トランスクリプトミクスおよびプロテオミクスで、有機酸や核酸塩基の代謝、翻訳、細胞周期、TCA cycleに関するプロセスや経路がアップレギュレートされており、特にプロテオミクスでは翻訳関連プロセスが顕著にアップレギュレートされていることが確認された。一方、CHO細胞のトランスクリプトミクスでは分泌に関わるプロセスや小胞体でのプロセッシングや糖鎖修飾に関わる経路がアップレギュレートされていた。CHO細胞のプロテオミクスでは小胞体とゴルジ体間の小胞輸送など、小胞輸送に関連するプロセスが広くアップレギュレートされていた。CHL-YN細胞は全体として、エネルギーやバイオマス生産、細胞周期に関わる経路が活性化しており、これらが高い増殖能を支えていることが示唆された。しかしながら、CHO細胞で小胞輸送や小胞体におけるプロセッシングに関わる経路が活性化していることが明らかとなり、CHL-YN細胞の分泌プロセスにおいて改善の余地が十分にあることが明らかとなった。CHO細胞において分泌プロセスに関わる経路が広く活性化していることが確認されたため、CHL-YN細胞の抗体生産能力を強化するためには、分泌プロセス全体を最適化するような形質細胞の分化マーカー等の発現制御によるセルエンジニアリングが有効であると考えられる。

5.1.2 本研究全体の総括

第二章の研究はこれまで強化手法の存在しなかった小胞体からゴルジ体への抗体輸

送を改善する手法として Sar1A の過剰発現が有効であることを示し、第三章では、小胞輸送も含めたこれまでボトルネックとして指摘されてきたプロセスから細胞内抗体や中間体の動態に基づき、ボトルネックを推定する方法を検討した。従って、第二章のような個別のプロセスに関する解析が第三章において着目するプロセスを決定するためには必要不可欠である。また、第三章のアプローチでは、抗体生産を劇的に改善するような因子を完全に同定することには限界があることも示されたため、第二章のような個別のプロセスにおける新しいボトルネックの発見とそれを改善する手法の確立が必要である。これまでは小胞体に関連する分泌プロセスを中心にボトルネックが指摘され、その改善手法が検討されてきた。今後は、ゴルジ体以降の小胞輸送等のプロセスに関しても強化手法の確立を目指していく必要があり、新しいボトルネックの発見やその強化手法の確立によって第三章のスクリーニング手法に関して着目するプロセスが増え、KD 細胞を用いた分泌プロファイルが充実し、それを用いたスクリーニングによってより確度の高いボトルネックの推定が可能となる。

第四章において、CHO 細胞は CHL-YN 細胞と比較して、小胞体におけるプロセッシングや小胞輸送などが分泌プロセスに関わる経路としてアップレギュレートしていた。従って、CHL-YN 細胞の分泌プロセスには広く改善できる余地があることが示唆され、第二章のような局所的な強化よりも、形質細胞の分化マーカーの過剰発現等の分泌プロセスを広く改善できる手法が最も有効であると考えられる。また、分泌プロセスを担う各遺伝子の発現量に着目すると、Sar1A の mRNA 発現量は CHL-IgG と CHO-K1-IgG 細胞の間で 5.94%しか差がなかった。一方、フォールディングやアセンブリ、輸送抗体の選別を担う BiP や PDI、ERGIC-53 の mRNA 発現量は CHO-K1-IgG 細胞のほうが CHL-IgG 細胞よりそれぞれ、2.88、2.54、3.34 倍高かった。CHO-K1-IgG 細胞は第二章において、Sar1A の発現量増加により主要なボトルネックと考えられる細胞内における抗体の蓄積が解消し、抗体の比生産速度が改善した。以上のことから個々の遺伝子の発現量の観点においても、CHL-IgG 細胞では小胞輸送だけでなく、フォールディングやアセンブリ、輸送抗体の選別等に関しても改善の余地があると考えられ、CHL-YN 細胞では分泌プロセスを広範に改善することが期待できるセルエンジニアリングが有効であると考えられる。また、CHL-YN 細胞由来の抗体生産株を構築し、高生産株をスクリーニングする中で、Sar1A や BiP、PDI は小胞輸送やフォールディング、アセンブリの能力が高い細胞を取得するための重要なバイオマーカーとなりうる。仮に、これらの遺伝子の発現量が CHO-K1-IgG 細胞等と同程度である細胞を取得できた場合はさらなる分泌プロセスの効率化に向け、第三章で実施した分泌プロセスにおけるボトルネックをスクリーニングする手法を適応することが有効であると考えられる。また、CHL-IgG 細胞に対して第三章で実施したスクリーニング方法を適応することで、CHL-YN 細胞における抗体の分泌プロセスにおける動態が根本的に CHO 細胞とどの程度異なっているのかを評価することができると考えられる。今回使用した CHL-IgG 細胞は CHO-K1-IgG 細胞と同様に Trastuzumab を生産する細胞株で

あるため、異なる抗体を発現させた場合に小胞体に関連する分泌プロセスにおいてどこがボトルネックとなりうるのかを第四章の手法によって推定することも重要である。

第二章ではセルエンジニアリングによって小胞体からゴルジ体への抗体輸送を促進する方法を検討し、第三章では分泌プロファイルを用いて推定したボトルネックをセルエンジニアリングによって改善することができるかどうか検証した。また、第四章では、CHL-YN 細胞の分泌プロセスを広く改善するために、形質細胞の分化マーカーの過剰発現によるセルエンジニアリングが有効である可能性が高いことに言及した。分泌プロセスにおける特定のボトルネックを解消するためには、細胞全体への影響を抑えながら特定のプロセスにアプローチできるセルエンジニアリングが有効である。しかしながら、セルエンジニアリングは任意の遺伝子を導入または、欠失させ、新たに細胞株を構築する必要があるため、その効果の検証に時間を要する。セルエンジニアリングを介さずに分泌プロセスを改善する方法として培養プロセスに関するアプローチがある。培養中の温度ダウンシフトは ERAD などの UPR に関する遺伝子発現を変化させることが報告されており、小胞体ストレスの低減により分泌プロセスを改善する¹⁶¹。また、化学シャペロンの添加は BiP などのシャペロンタンパク質と同様に、組換えタンパク質のフォールディングを促進することで分泌プロセスを改善した¹⁶²。これらの手法は、その効果の検証に要する時間がセルエンジニアリングと比較して短いため、より簡易的に抗体生産プロセスへの適応が可能である。しかしながら、物理的パラメータの変化や培地への添加物は分泌プロセスのみならず、細胞に対してより広範な影響を与える可能性が高い。また、特定のボトルネックに対しては有効な添加剤や物理的パラメータの変更方法が報告されていない場合もある。従って、ボトルネックとなっている分泌プロセスやその深刻度、またはプロセス開発における時間的制約などを加味しながら、適切な方法を選択、または組み合わせていくことが望ましい。

本研究により、これまで報告されている小胞体への抗体の蓄積を改善する手法の開発、異種 IgG1 抗体の分泌プロセスにおけるボトルネックを推定する手法の開発、そして、網羅的解析による CHL-YN 細胞の分泌プロセスおよび、高増殖能に関わるメカニズムの基盤的知見の収集が達成された。これらは CHO 細胞を始めとする抗体生産宿主細胞の分泌プロセスへの理解と高度な制御を達成するために必要な個別のプロセスへのアプローチ、トップダウンアプローチ、そして水平方向へのアプローチであり、抗体医薬品生産のさらなる効率化、堅牢化に寄与すると期待される。

5.2 今後の展望

抗体医薬品の市場は今後も拡大し、バイオ医薬品市場を牽引していくと見込まれる¹⁶³。それに伴って、二重特異性抗体をはじめとする高度にエンジニアリングされた抗体の開発も拡大していくと考えられ、増加する需要と幅広い抗体ベースの医薬品の生産に対応するために、分泌プロセスへの理解と高度な制御技術の開発を加速させていく必要がある。また、新規の宿主細胞も数多く開発されており、CHO 細胞をベースにこれまで築かれ

てきた知見を用いて、新規の宿主細胞の応用範囲の拡大や新しい生産方法の探索を推進して行く必要がある。

第二章において、Sar1A を小胞体に抗体が蓄積している CHO 細胞で過剰発現することで小胞体からゴルジ体への抗体輸送を改善し、抗体の比生産速度を増強することができることが明らかとなった。しかしながら、本手法は小胞体からゴルジ体への順行輸送のみを促進すると考えられ、Sar1A を過剰発現した CHO 細胞において UPR が強く誘導されたため、小胞体の恒常性に影響を与えることが示唆された。従って、流加培養や灌流培養など、長期の培養に応用する際には、小胞体の恒常性を維持するために、逆行輸送の活性化も同時に行い、小胞体とゴルジ体間の物質移動のバランスを維持する必要があると考えられる。例えば、Sar1A と同様に GTPase であり、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送を担う COPI 小胞の形成に関与する Arf1 を Sar1A と共過剰発現することで小胞体の構成成分を効率よく小胞体へ回収することが可能になるかもしれない。また、これまで報告されている分泌プロセスにおけるボトルネックは主に小胞体を中心としたプロセスであったという背景もあり、ゴルジ体を中心とした小胞輸送等のプロセスに関しては、本章のような局所的なボトルネックを改善する手法があまり確立されていない。従って、分泌プロセスを高度に制御するためには、細胞外へ分泌されるまでの過程、すなわち、ゴルジ体や細胞膜に関する小胞輸送等プロセスについても同様に、ボトルネックの探索と改善手法の確立を実施していくことが重要である。

第三章において、小胞体に関連する分泌プロセスに人工的にボトルネックを誘導し、各プロセスにおけるボトルネックと抗体生産や細胞内抗体の分泌や蓄積の関係性を明らかにし、KD 細胞を用いて得られた分泌プロセスを活用して、3 種類の抗体生産株のボトルネックを推定した。さらに、各プロセスを担う遺伝子を 3 種類の抗体生産株で過剰発現させ、抗体の比生産速度を評価することでボトルネックの推定の妥当性を検証した。本章では、主に 4 つのプロセスに関して、5 つの遺伝子を標的としてノックダウンすることでボトルネックを人工的に誘導しているが、これらのプロセスには他にも多種多様なタンパク質が関与しているため、それらを標的としてノックダウンし、同様の検証を行うことで、各プロセス内での一貫性や標的タンパク質による影響の相違を評価することができる。また、ゴルジ体以降の分泌プロセスに関しても同様の検証を行うことで、分泌プロセス全体におけるボトルネックの推定が可能となる可能性がある。さらに、本章で得られた知見をベースに分泌プロセスをモデル化することでより定量的な評価が可能となる。ハイブリドーマの抗体の分泌プロセスをモデル化した先行研究と同様に^{164,165}、CHO 細胞の細胞内抗体や中間体のプロセッシングの過程をモデル化し、CHX や BFA 添加実験における各 KD 細胞の細胞内抗体や中間体濃度の変化をインプットすることで、ボトルネックが生じたプロセスをより定量的に評価することができると考えられる。本章では、細胞内のすべての抗体や中間体を定量していたが、小胞体とゴルジ体や、それ以外に存在する抗体を分離して定量することが容易にできるようになれば、より正確にボトルネックを推定することが

可能になる。

第四章では、オミクスプロファイリングによって **CHL-YN** 細胞においてエネルギーやバイオマスの生産および、細胞周期に関わるプロセスや経路が活性化しており、**CHO** 細胞では小胞輸送など、分泌プロセスに関わる経路やプロセスが活性化していることが明らかとなった。特に、**CHL-YN** 細胞では翻訳に関わるプロセスのアップレギュレートが顕著であったため、分泌を必要としない膜タンパク質等の生産に非常に優位性を有している可能性がある。また、**CHO** 細胞は **CHL-YN** 細胞と比較して、小胞輸送や小胞体におけるプロセッシング等、分泌プロセスに関わるプロセスが全体的に活性していたため、**CHL-YN** 細胞の抗体生産能を増強するためには、局所的な強化よりも、形質細胞の分化マーカーのような分泌プロセス全体を最適化するマスターレギュレーターを過剰発現させることが有効であると考えられる。本章において、**CHL-YN** 細胞の高い増殖能を維持するプロセスとして、細胞増殖に必要なバイオマスやエネルギー生産および **DNA** の複製等の細胞周期に関わる経路の活性化が認められた。従って、これらの経路に焦点を絞り、さらに詳細な解析を行うことで、従来の **CHO** 細胞の増殖速度を改善することができる可能性がある。

分泌プロセスへの理解と高度な制御を可能にするために、今後、必要と考えられる上記の個別のプロセスへのアプローチ、トップダウンアプローチ、水平方向へのアプローチに関するそれぞれの研究をバランスよく実施することが重要である。それぞれのアプローチが互いを補完し合い、相乗効果を発揮することでより効率的で堅牢なバイオ医薬品生産のプロセスが確立されると期待される。

参考文献

- 1 Fahey, J. L. & McKelvey, E. M. Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *J. Immunol.* **94**, 84-90 (1965).
- 2 Edelman, G. M., Cunningham, B. A., Gall, W. E., Gottlieb, P. D., Rutishauser, U. & Waxdal, M. J. The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **63**, 78-85, doi:10.1073/pnas.63.1.78 (1969).
- 3 Papadea, C. & Check, I. J. Human immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses: biochemical, genetic, and clinical aspects. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **27**, 27-58, doi:10.3109/10408368909106589 (1989).
- 4 Porter, R. R. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.* **73**, 119-126, doi:10.1042/bj0730119 (1959).
- 5 Moeller, E. Antagonistic effects of humoral isoantibodies on the in vitro cytotoxicity of immune lymphoid cells. *J. Exp. Med.* **122**, 11-23, doi:10.1084/jem.122.1.11 (1965).
- 6 Nossal, G. J. & Makela, O. Kinetic studies on the incidence of cells appearing to form two antibodies. *J. Immunol.* **88**, 604-612 (1962).
- 7 Varadé, J., Magadán, S. & González-Fernández, Á. Human immunology and immunotherapy: main achievements and challenges. *Cell. Mol. Immunol.* **18**, 805-828, doi:10.1038/s41423-020-00530-6 (2021).
- 8 Underhill, D. M., Gordon, S., Imhof, B. A., Núñez, G. & Bousso, P. Élie Metchnikoff (1845-1916): celebrating 100 years of cellular immunology and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 651-656, doi:10.1038/nri.2016.89 (2016).
- 9 Daéron, M. The function of antibodies. *Immunol. Rev.* **328**, 113-125, doi:10.1111/imr.13387 (2024).
- 10 Sgro, C. Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. *Toxicology* **105**, 23-29, doi:10.1016/0300-483x(95)03123-w (1995).
- 11 Weiner, L. M. Fully human therapeutic monoclonal antibodies. *J. Immunother.* **29**, 1-9, doi:10.1097/01.cji.0000192105.24583.83 (2006).
- 12 Vaswani, S. K. & Hamilton, R. G. Humanized antibodies as potential therapeutic drugs. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* **81**, 105-115; quiz 115-106, 119, doi:10.1016/s1081-1206(10)62794-9 (1998).
- 13 Harding, F. A., Stickler, M. M., Razo, J. & DuBridge, R. B. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. *MAbs* **2**, 256-265, doi:10.4161/mabs.2.3.11641 (2010).
- 14 Booth, B. J., Ramakrishnan, B., Narayan, K., Wollacott, A. M., Babcock, G. J.,

- Shriver, Z. & Viswanathan, K. Extending human IgG half-life using structure-guided design. *MAbs* **10**, 1098-1110, doi:10.1080/19420862.2018.1490119 (2018).
- 15 Damelang, T., Brinkhaus, M., van Osch, T. L. J., Schuurman, J., Labrijn, A. F., Rispens, T. & Vidarsson, G. Impact of structural modifications of IgG antibodies on effector functions. *Front. Immunol.* **14**, 1304365, doi:10.3389/fimmu.2023.1304365 (2023).
- 16 Weinblatt, M. E., Keystone, E. C., Furst, D. E., Moreland, L. W., Weisman, M. H., Birbara, C. A., Teoh, L. A., Fischkoff, S. A. & Chartash, E. K. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum.* **48**, 35-45, doi:10.1002/art.10697 (2003).
- 17 Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J. & Norton, L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* **344**, 783-792, doi:10.1056/nejm200103153441101 (2001).
- 18 McLaughlin, P., Grillo-López, A. J., Link, B. K., Levy, R., Czuczman, M. S., Williams, M. E., Heyman, M. R., Bence-Bruckler, I., White, C. A., Cabanillas, F., Jain, V., Ho, A. D., Lister, J., Wey, K., Shen, D. & Dallaire, B. K. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J. Clin. Oncol.* **16**, 2825-2833, doi:10.1200/jco.1998.16.8.2825 (1998).
- 19 Tay-Teo, K., Ilbawi, A. & Hill, S. R. Comparison of sales income and research and development costs for FDA-approved cancer drugs sold by originator drug companies. *JAMA Netw Open* **2**, e186875, doi:10.1001/jamanetworkopen.2018.6875 (2019).
- 20 Rome, B. N., Bhaskar, A. & Kesselheim, A. S. Use, spending, and prices of adalimumab following biosimilar competition. *JAMA Health Forum* **5**, e243964, doi:10.1001/jamahealthforum.2024.3964 (2024).
- 21 Martin, K. P., Grimaldi, C., Grempler, R., Hansel, S. & Kumar, S. Trends in industrialization of biotherapeutics: a survey of product characteristics of 89 antibody-based biotherapeutics. *MAbs* **15**, 2191301, doi:10.1080/19420862.2023.2191301 (2023).
- 22 Farid, S. S., Baron, M., Stamatis, C., Nie, W. & Coffman, J. Benchmarking biopharmaceutical process development and manufacturing cost contributions to R&D. *MAbs* **12**, 1754999, doi:10.1080/19420862.2020.1754999 (2020).

- 23 Khetan, R., Curtis, R., Deane, C. M., Hadsund, J. T., Kar, U., Krawczyk, K., Kuroda, D., Robinson, S. A., Sormanni, P., Tsumoto, K., Warwicker, J. & Martin, A. C. R. Current advances in biopharmaceutical informatics: guidelines, impact and challenges in the computational developability assessment of antibody therapeutics. *MAbs* **14**, 2020082, doi:10.1080/19420862.2021.2020082 (2022).
- 24 Hariu, A., Shirahata, Y., Shinohara, K. & Kuribayashi, R. The 100(th) monoclonal antibody product is approved in Japan. *Aaps j* **27**, 105, doi:10.1208/s12248-025-01091-0 (2025).
- 25 Mahlangu, J., Oldenburg, J., Paz-Priel, I., Negrier, C., Niggli, M., Mancuso, M. E., Schmitt, C., Jiménez-Yuste, V., Kempton, C., Dhalluin, C., Callaghan, M. U., Bujan, W., Shima, M., Adamkewicz, J. I., Asikanius, E., Levy, G. G. & Kruse-Jarres, R. Emicizumab prophylaxis in patients who have Hemophilia A without inhibitors. *N. Engl. J. Med.* **379**, 811-822, doi:10.1056/NEJMoa1803550 (2018).
- 26 Surowka, M. & Klein, C. A pivotal decade for bispecific antibodies? *MAbs* **16**, 2321635, doi:10.1080/19420862.2024.2321635 (2024).
- 27 Kantarjian, H., Stein, A., Gökbuget, N., Fielding, A. K., Schuh, A. C., Ribera, J. M., Wei, A., Dombret, H., Foà, R., Bassan, R., Arslan, Ö., Sanz, M. A., Bergeron, J., Demirkan, F., Lech-Maranda, E., Rambaldi, A., Thomas, X., Horst, H. A., Brüggemann, M., Klapper, W., Wood, B. L., Fleishman, A., Nagorsen, D., Holland, C., Zimmerman, Z. & Topp, M. S. Blinatumomab versus chemotherapy for advanced acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **376**, 836-847, doi:10.1056/NEJMoa1609783 (2017).
- 28 Wang, S., Chen, K., Lei, Q., Ma, P., Yuan, A. Q., Zhao, Y., Jiang, Y., Fang, H., Xing, S., Fang, Y., Jiang, N., Miao, H., Zhang, M., Sun, S., Yu, Z., Tao, W., Zhu, Q., Nie, Y. & Li, N. The state of the art of bispecific antibodies for treating human malignancies. *EMBO Mol. Med.* **13**, e14291, doi:10.15252/emmm.202114291 (2021).
- 29 Ibbotson, T., McGavin, J. K. & Goa, K. L. Abciximab: an updated review of its therapeutic use in patients with ischaemic heart disease undergoing percutaneous coronary revascularisation. *Drugs* **63**, 1121-1163, doi:10.2165/00003495-200363110-00014 (2003).
- 30 Fu, Z., Li, S., Han, S., Shi, C. & Zhang, Y. Antibody drug conjugate: the "biological missile" for targeted cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther* **7**, 93, doi:10.1038/s41392-022-00947-7 (2022).
- 31 Verma, S., Miles, D., Gianni, L., Krop, I. E., Welslau, M., Baselga, J., Pegram, M., Oh, D. Y., Diéras, V., Guardino, E., Fang, L., Lu, M. W., Olsen, S. & Blackwell,

- K. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1783-1791, doi:10.1056/NEJMoa1209124 (2012).
- 32 Song, C. H., Jeong, M., In, H., Kim, J. H., Lin, C. W. & Han, K. H. Trends in the development of antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Antibodies (Basel)* **12**, doi:10.3390/antib12040072 (2023).
- 33 Kelley, B. The history and potential future of monoclonal antibody therapeutics development and manufacturing in four eras. *MAbs* **16**, 2373330, doi:10.1080/19420862.2024.2373330 (2024).
- 34 Kunert, R. & Reinhart, D. Advances in recombinant antibody manufacturing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 3451-3461, doi:10.1007/s00253-016-7388-9 (2016).
- 35 Walsh, G. & Walsh, E. Biopharmaceutical benchmarks 2022. *Nat. Biotechnol.* **40**, 1722-1760, doi:10.1038/s41587-022-01582-x (2022).
- 36 Puck, T. T., Cieciura, S. J. & Robinson, A. Genetics of somatic mammalian cells. III. long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.* **108**, 945-956, doi:10.1084/jem.108.6.945 (1958).
- 37 Kao, F. T. & Puck, T. T. Genetics of somatic mammalian cells, VII. induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **60**, 1275-1281, doi:10.1073/pnas.60.4.1275 (1968).
- 38 Urlaub, G. & Chasin, L. A. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 4216-4220, doi:10.1073/pnas.77.7.4216 (1980).
- 39 Zhang, M., Zhao, X., Li, Y., Ye, Q., Wu, Y., Niu, Q., Zhang, Y., Fan, G., Chen, T., Xia, J. & Wu, Q. Advances in serum-free media for CHO cells: from traditional serum substitutes to microbial-derived substances. *Biotechnol. J.* **19**, e2400251, doi:10.1002/biot.202400251 (2024).
- 40 Ha, T. K., Òdena, A., Karottki, K. J. C., Kim, C. L., Hefzi, H., Lee, G. M., Faustrup Kildegaard, H., Nielsen, L. K., Grav, L. M. & Lewis, N. E. Enhancing CHO cell productivity through a dual selection system using Aspg and Gs in glutamine free medium. *Biotechnol. Bioeng.* **120**, 1159-1166, doi:10.1002/bit.28318 (2023).
- 41 Bebbington, C., Renner, G., Thomson, S., King, D., Abrams, D. & Yarranton, G. High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker. *Biotechnology (N. Y.)* **10**, 169-175, doi:10.1038/nbt0292-169 (1992).
- 42 Kaufman, R. J. & Sharp, P. A. Amplification and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary DNA gene.

- J. Mol. Biol.* **159**, 601-621, doi:10.1016/0022-2836(82)90103-6 (1982).
- 43 Huang, Y. M., Hu, W., Rustandi, E., Chang, K., Yusuf-Makagiansar, H. & Ryll, T. Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnol. Prog.* **26**, 1400-1410, doi:10.1002/btpr.436 (2010).
 - 44 Ling, W. L., Bai, Y., Cheng, C., Padawer, I. & Wu, C. Development and manufacturability assessment of chemically-defined medium for the production of protein therapeutics in CHO cells. *Biotechnol. Prog.* **31**, 1163-1171, doi:10.1002/btpr.2108 (2015).
 - 45 Karst, D. J., Steinebach, F., Soos, M. & Morbidelli, M. Process performance and product quality in an integrated continuous antibody production process. *Biotechnol. Bioeng.* **114**, 298-307, doi:10.1002/bit.26069 (2017).
 - 46 Clincke, M. F., Mölleryd, C., Zhang, Y., Lindskog, E., Walsh, K. & Chotteau, V. Very high density of CHO cells in perfusion by ATF or TFF in WAVE bioreactor™. part I. effect of the cell density on the process. *Biotechnol. Prog.* **29**, 754-767, doi:10.1002/btpr.1704 (2013).
 - 47 Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A., Kiss, R. & Amanullah, A. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs* **2**, 466-479, doi:10.4161/mabs.2.5.12720 (2010).
 - 48 Wang, X. Y., Zhang, J. H., Zhang, X., Sun, Q. L., Zhao, C. P. & Wang, T. Y. Impact of different promoters on episomal vectors harbouring characteristic motifs of matrix attachment regions. *Sci. Rep.* **6**, 26446, doi:10.1038/srep26446 (2016).
 - 49 Inniss, M. C., Bandara, K., Jusiak, B., Lu, T. K., Weiss, R., Wroblewska, L. & Zhang, L. A novel Bxb1 integrase RMCE system for high fidelity site-specific integration of mAb expression cassette in CHO Cells. *Biotechnol. Bioeng.* **114**, 1837-1846, doi:10.1002/bit.26268 (2017).
 - 50 Gaidukov, L., Wroblewska, L., Teague, B., Nelson, T., Zhang, X., Liu, Y., Jagtap, K., Mamo, S., Tseng, W. A., Lowe, A., Das, J., Bandara, K., Baijuraj, S., Summers, N. M., Lu, T. K., Zhang, L. & Weiss, R. A multi-landing pad DNA integration platform for mammalian cell engineering. *Nucleic Acids Res.* **46**, 4072-4086, doi:10.1093/nar/gky216 (2018).
 - 51 Zeh, N., Schmidt, M., Schulz, P. & Fischer, S. The new frontier in CHO cell line development: From random to targeted transgene integration technologies. *Biotechnol. Adv.* **75**, 108402, doi:10.1016/j.biotechadv.2024.108402 (2024).
 - 52 Hung, F., Deng, L., Ravnikar, P., Condon, R., Li, B., Do, L., Saha, D., Tsao, Y. S., Merchant, A., Liu, Z. & Shi, S. mRNA stability and antibody production in CHO

- cells: improvement through gene optimization. *Biotechnol. J.* **5**, 393-401, doi:10.1002/biot.200900192 (2010).
- 53 Haredy, A. M., Nishizawa, A., Honda, K., Ohya, T., Ohtake, H. & Omasa, T. Improved antibody production in Chinese hamster ovary cells by ATF4 overexpression. *Cytotechnology* **65**, 993-1002, doi:10.1007/s10616-013-9631-x (2013).
- 54 Masuda, K., Kubota, M., Nakazawa, Y., Iwama, C., Watanabe, K., Ishikawa, N., Tanabe, Y., Kono, S., Tanemura, H., Takahashi, S., Makino, T., Okumura, T., Horiuchi, T., Nonaka, K., Murakami, S., Kamihira, M. & Omasa, T. Establishment of a novel cell line, CHO-MK, derived from Chinese hamster ovary tissues for biologics manufacturing. *J. Biosci. Bioeng.* **137**, 471-479, doi:10.1016/j.jbiosc.2024.02.005 (2024).
- 55 Yamano-Adachi, N., Arishima, R., Puriwat, S. & Omasa, T. Establishment of fast-growing serum-free immortalised cells from Chinese hamster lung tissues for biopharmaceutical production. *Sci. Rep.* **10**, 17612, doi:10.1038/s41598-020-74735-0 (2020).
- 56 Sukwattananipaat, P., Kuroda, H., Yamano-Adachi, N. & Omasa, T. Metabolomic characterization of monoclonal antibody-producing Chinese hamster lung (CHL)-YN cells in glucose-controlled serum-free fed-batch operation. *Biotechnol. Bioeng.* **121**, 2848-2867, doi:10.1002/bit.28777 (2024).
- 57 Feige, M. J. & Buchner, J. Principles and engineering of antibody folding and assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **1844**, 2024-2031, doi:10.1016/j.bbapap.2014.06.004 (2014).
- 58 Haas, I. G. & Wabl, M. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* **306**, 387-389, doi:10.1038/306387a0 (1983).
- 59 Bole, D. G., Hendershot, L. M. & Kearney, J. F. Posttranslational association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains in nonsecreting and secreting hybridomas. *J. Cell Biol.* **102**, 1558-1566, doi:10.1083/jcb.102.5.1558 (1986).
- 60 Feige, M. J., Hendershot, L. M. & Buchner, J. How antibodies fold. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 189-198, doi:10.1016/j.tibs.2009.11.005 (2010).
- 61 Baines, A. C. & Zhang, B. Receptor-mediated protein transport in the early secretory pathway. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 381-388, doi:10.1016/j.tibs.2007.06.006 (2007).
- 62 Zhang, Y., Srivastava, V. & Zhang, B. Mammalian cargo receptors for endoplasmic reticulum-to-Golgi transport: mechanisms and interactions.

- Biochem. Soc. Trans.* **51**, 971-981, doi:10.1042/bst20220713 (2023).
- 63 Dancourt, J. & Barlowe, C. Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 777-802, doi:10.1146/annurev-biochem-061608-091319 (2010).
- 64 Araki, K. & Nagata, K. Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a007526, doi:10.1101/cshperspect.a007526 (2011).
- 65 Chakrabarti, A., Chen, A. W. & Varner, J. D. A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol. Bioeng.* **108**, 2777-2793, doi:10.1002/bit.23282 (2011).
- 66 Torres, M., Hussain, H. & Dickson, A. J. The secretory pathway - the key for unlocking the potential of Chinese hamster ovary cell factories for manufacturing therapeutic proteins. *Crit. Rev. Biotechnol.* **43**, 628-645, doi:10.1080/07388551.2022.2047004 (2023).
- 67 de StGroth, S. F. & Scheidegger, D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Methods* **35**, 1-21, doi:10.1016/0022-1759(80)90146-5 (1980).
- 68 Randall, T. D., Parkhouse, R. M. & Corley, R. B. J chain synthesis and secretion of hexameric IgM is differentially regulated by lipopolysaccharide and interleukin 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 962-966, doi:10.1073/pnas.89.3.962 (1992).
- 69 Khan, S. U. & Schröder, M. Engineering of chaperone systems and of the unfolded protein response. *Cytotechnology* **57**, 207-231, doi:10.1007/s10616-008-9157-9 (2008).
- 70 Torres, M. & Dickson, A. J. Overexpression of transcription factor BLIMP1/prdm1 leads to growth inhibition and enhanced secretory capacity in Chinese hamster ovary cells. *Metab. Eng.* **67**, 237-249, doi:10.1016/j.ymben.2021.07.004 (2021).
- 71 Torres, M. & Dickson, A. J. Reprogramming of Chinese hamster ovary cells towards enhanced protein secretion. *Metab. Eng.* **69**, 249-261, doi:10.1016/j.ymben.2021.12.004 (2022).
- 72 Le Fourn, V., Girod, P. A., Buceta, M., Regamey, A. & Mermoud, N. CHO cell engineering to prevent polypeptide aggregation and improve therapeutic protein secretion. *Metab. Eng.* **21**, 91-102, doi:10.1016/j.ymben.2012.12.003 (2014).
- 73 Mathias, S., Wippermann, A., Raab, N., Zeh, N., Handrick, R., Gorr, I., Schulz, P., Fischer, S., Gamer, M. & Otte, K. Unraveling what makes a monoclonal antibody difficult-to-express: From intracellular accumulation to incomplete

- p>
folding and degradation via ERAD.
- Biotechnol. Bioeng.*
- 117**
- , 5-16, doi:10.1002/bit.27196 (2020).
- 74 Barzadd, M. M., Lundqvist, M., Harris, C., Malm, M., Volk, A. L., Thalén, N., Chotteau, V., Grassi, L., Smith, A., Abadi, M. L., Lambiase, G., Gibson, S., Hatton, D. & Rockberg, J. Autophagy and intracellular product degradation genes identified by systems biology analysis reduce aggregation of bispecific antibody in CHO cells. *N. Biotechnol.* **68**, 68-76, doi:10.1016/j.nbt.2022.01.010 (2022).
 - 75 Kaneyoshi, K., Uchiyama, K., Onitsuka, M., Yamano, N., Koga, Y. & Omasa, T. Analysis of intracellular IgG secretion in Chinese hamster ovary cells to improve IgG production. *J. Biosci. Bioeng.* **127**, 107-113, doi:10.1016/j.jbiosc.2018.06.018 (2019).
 - 76 Pybus, L. P., Dean, G., West, N. R., Smith, A., Daramola, O., Field, R., Wilkinson, S. J. & James, D. C. Model-directed engineering of "difficult-to-express" monoclonal antibody production by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* **111**, 372-385, doi:10.1002/bit.25116 (2014).
 - 77 Borth, N., Mattanovich, D., Kunert, R. & Katinger, H. Effect of increased expression of protein disulfide isomerase and heavy chain binding protein on antibody secretion in a recombinant CHO cell line. *Biotechnol. Prog.* **21**, 106-111, doi:10.1021/bp0498241 (2005).
 - 78 Kirimoto, Y., Yamano-Adachi, N., Koga, Y. & Omasa, T. Effect of co-overexpression of the cargo receptor ERGIC-53/MCFD2 on antibody production and intracellular IgG secretion in recombinant Chinese hamster ovary cells. *J. Biosci. Bioeng.*, doi:10.1016/j.jbiosc.2022.07.002 (2022).
 - 79 Raab, N., Zeh, N., Kretz, R., Weiß, L., Stadermann, A., Lindner, B., Fischer, S., Stoll, D. & Otte, K. Nature as blueprint: Global phenotype engineering of CHO production cells based on a multi-omics comparison with plasma cells. *Metab. Eng.* **83**, 110-122, doi:10.1016/j.ymben.2024.03.007 (2024).
 - 80 Nishimiya, D. Proteins improving recombinant antibody production in mammalian cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 1031-1042, doi:10.1007/s00253-013-5427-3 (2014).
 - 81 Peotter, J., Kasberg, W., Pustova, I. & Audhya, A. COPII-mediated trafficking at the ER/ERGIC interface. *Traffic* **20**, 491-503, doi:10.1111/tra.12654 (2019).
 - 82 Stagg, S. M., LaPointe, P., Razvi, A., Gürkan, C., Potter, C. S., Carragher, B. & Balch, W. E. Structural basis for cargo regulation of COPII coat assembly. *Cell* **134**, 474-484 (2008).
 - 83 Melville, D. B., Studer, S. & Schekman, R. Small sequence variations between

- two mammalian paralogs of the small GTPase SAR1 underlie functional differences in coat protein complex II assembly. *J. Biol. Chem.* **295**, 8401-8412, doi:10.1074/jbc.ra120.012964 (2020).
- 84 D'Arcangelo, J. G., Stahmer, K. R. & Miller, E. A. Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 2464-2472, doi:10.1016/j.bbamcr.2013.02.003 (2013).
- 85 Orellana, C. A., Marcellin, E., Schulz, B. L., Nouwens, A. S., Gray, P. P. & Nielsen, L. K. High-antibody-producing Chinese hamster ovary cells up-regulate intracellular protein transport and glutathione synthesis. *J. Proteome Res.* **14**, 609-618, doi:10.1021/pr501027c (2015).
- 86 Onitsuka, M. & Omasa, T. Rapid evaluation of *N*-glycosylation status of antibodies with chemiluminescent lectin-binding assay. *J. Biosci. Bioeng.* **120**, 107-110, doi:10.1016/j.jbiosc.2014.11.015 (2015).
- 87 Ohya, T., Hayashi, T., Kiyama, E., Nishii, H., Miki, H., Kobayashi, K., Honda, K., Omasa, T. & Ohtake, H. Improved production of recombinant human antithrombin III in Chinese hamster ovary cells by ATF4 overexpression. *Biotechnol. Bioeng.* **100**, 317-324, doi:10.1002/bit.21758 (2008).
- 88 Omasa, T., Higashiyama, K.-I., Shioya, S. & Suga, K.-I. Effects of lactate concentration on hybridoma culture in lactate-controlled fed-batch operation. *Biotechnol. Bioeng.* **39**, 556-564, doi:10.1002/bit.260390511 (1992).
- 89 Pearson, K. VII. Mathematical contributions to the theory of evolution.—III. Regression, heredity, and panmixia. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical or Physical Character* **187**, 253-318, doi:10.1098/rsta.1896.0007 (1896).
- 90 Kapur, J. N., Sahoo, P. K. & Wong, A. K. C. A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing* **29**, 273-285, doi:10.1016/0734-189X(85)90125-2 (1985).
- 91 Stauffer, W., Sheng, H. & Lim, H. N. EzColocalization: An ImageJ plugin for visualizing and measuring colocalization in cells and organisms. *Sci. Rep.* **8**, doi:10.1038/s41598-018-33592-8 (2018).
- 92 Kondo, A., Suzuki, J., Kuraya, N., Hase, S., Kato, I. & Ikenaka, T. Improved method for fluorescence labeling of sugar chains with sialic acid residues. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 2169-2170, doi:10.1080/00021369.1990.10870232 (1990).
- 93 Limkul, J., Iizuka, S., Sato, Y., Misaki, R., Ohashi, T., Ohashi, T. & Fujiyama, K. The production of human glucocerebrosidase in glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* plants. *Plant Biotechnology Journal* **14**, 1682-1694,

- doi:10.1111/pbi.12529 (2016).
- 94 Kirley, T. L., Greis, K. D. & Norman, A. B. Domain unfolding of monoclonal antibody fragments revealed by non-reducing SDS-PAGE. *Biochem Biophys Res* **16**, 138-144, doi:10.1016/j.bbrep.2018.10.004 (2018).
 - 95 McDonald, J. H. & Dunn, K. W. Statistical tests for measures of colocalization in biological microscopy. *J. Microsc.* **252**, 295-302, doi:10.1111/jmi.12093 (2013).
 - 96 Aaron, J. S., Taylor, A. B. & Chew, T.-L. Image co-localization – co-occurrence versus correlation. *J. Cell Sci.* **131**, jcs211847, doi:10.1242/jcs.211847 (2018).
 - 97 Appenzeller, C., Andersson, H., Kappeler, F. & Hauri, H.-P. The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins. *Nat. Cell Biol.* **1**, 330-334, doi:10.1038/14020 (1999).
 - 98 Hauri, H. P., Kappeler, F., Andersson, H. & Appenzeller, C. ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J. Cell Sci.* **113**, 587-596, doi:10.1242/jcs.113.4.587 (2000).
 - 99 Malhotra, J. D., Miao, H., Zhang, K., Wolfson, A., Pennathur, S., Pipe, S. W. & Kaufman, R. J. Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 18525-18530, doi:10.1073/pnas.0809677105 (2008).
 - 100 Du, Z., Treiber, D., McCoy, R. E., Miller, A. K., Han, M., He, F., Domnitz, S., Heath, C. & Reddy, P. Non-invasive UPR monitoring system and its applications in CHO production cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 2184-2194, doi:10.1002/bit.24877 (2013).
 - 101 Murphy, T. C., Woods, N. R. & Dickson, A. J. Expression of the transcription factor GADD153 is an indicator of apoptosis for recombinant chinese hamster ovary (CHO) cells. *Biotechnol. Bioeng.* **75**, 621-629, doi:10.1002/bit.1190 (2001).
 - 102 Hetz, C., Chevet, E. & Oakes, S. A. Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat. Cell Biol.* **17**, 829-838, doi:10.1038/ncb3184 (2015).
 - 103 Tabas, I. & Ron, D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell Biol.* **13**, 184-190, doi:10.1038/ncb0311-184 (2011).
 - 104 Maldonado-Agurto, R. & Dickson, A. J. Multiplexed digital mRNA expression analysis profiles system-wide changes in mRNA abundance and responsiveness of UPR-specific gene expression changes during batch culture of recombinant Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. J.* **13**, e1700429, doi:10.1002/biot.201700429 (2018).
 - 105 Kyeong, M. & Lee, J. S. Endogenous BiP reporter system for simultaneous

- identification of ER stress and antibody production in Chinese hamster ovary cells. *Metab. Eng.* **72**, 35-45, doi:10.1016/j.ymben.2022.02.002 (2022).
- 106 Onitsuka, M., Tatsuzawa, M., Asano, R., Kumagai, I., Shirai, A., Maseda, H. & Omasa, T. Trehalose suppresses antibody aggregation during the culture of Chinese hamster ovary cells. *J. Biosci. Bioeng.* **117**, 632-638, doi:10.1016/j.jbiosc.2013.10.022 (2014).
- 107 Xu, J., Santos, J., Anderson, N. S., Borys, M. C., Pendse, G. & Li, Z. J. Antibody charge variant modulation by in vitro enzymatic treatment in different Chinese hamster ovary cell cultures. *Biotechnol. Prog.* **38**, doi:10.1002/btpr.3268 (2022).
- 108 Liu, L. Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *J. Pharm. Sci.* **104**, 1866-1884, doi:10.1002/jps.24444 (2015).
- 109 Donini, R., Haslam, S. M. & Kontoravdi, C. Glycoengineering Chinese hamster ovary cells: a short history. *Biochem. Soc. Trans.* **49**, 915-931, doi:10.1042/bst20200840 (2021).
- 110 Bollati-Fogolín, M., Forno, G., Nimtz, M., Conradt, H. S., Etcheverrigaray, M. & Kratje, R. Temperature reduction in cultures of hGM-CSF-expressing CHO cells: effect on productivity and product quality. *Biotechnol. Prog.* **21**, 17-21, doi:10.1021/bp049825t (2008).
- 111 Yamano, N. & Omasa, T. EGCG improves recombinant protein productivity in Chinese hamster ovary cell cultures via cell proliferation control. *Cytotechnology* **70**, 1697-1706, doi:10.1007/s10616-018-0243-3 (2018).
- 112 Naito, Y., Yoshimura, J., Morishita, S. & Ui-Tei, K. siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect. *BMC Bioinformatics* **10**, 392, doi:10.1186/1471-2105-10-392 (2009).
- 113 Duetz, W. A., Rüedi, L., Hermann, R., O'Connor, K., Büchs, J. & Witholt, B. Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2641-2646, doi:10.1128/aem.66.6.2641-2646.2000 (2000).
- 114 Milo, R. What is the total number of protein molecules per cell volume? A call to rethink some published values. *Bioessays* **35**, 1050-1055, doi:10.1002/bies.201300066 (2013).
- 115 Akbarzadeh-Sharbat, S., Yakhchali, B., Minuchehr, Z., Shokrgozar, M. A. & Zeinali, S. Expression enhancement in trastuzumab therapeutic monoclonal antibody production using genomic amplification with methotrexate. *Avicenna J Med Biotechnol* **5**, 87-95 (2013).

- 116 Boulenouar, H., Bouchoutrouch, N., Amar, Y., Faouzi, M. E. A., Cherrah, Y., Sefrioui, H. & Benhassou, H. A. Strategy for developing a stable CHO cell line that produces large titers of trastuzumab antibody. *Front Biosci (Elite Ed)* **15**, 24, doi:10.31083/j.fbe1504024 (2023).
- 117 Nyfeler, B., Nufer, O., Matsui, T., Mori, K. & Hauri, H. P. The cargo receptor ERGIC-53 is a target of the unfolded protein response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 599-604, doi:10.1016/s0006-291x(03)00634-x (2003).
- 118 Itin, C., Roche, A. C., Monsigny, M. & Hauri, H. P. ERGIC-53 is a functional mannose-selective and calcium-dependent human homologue of leguminous lectins. *Mol. Biol. Cell* **7**, 483-493, doi:10.1091/mbc.7.3.483 (1996).
- 119 Feige, M. J., Groscurth, S., Marciniowski, M., Shimizu, Y., Kessler, H., Hendershot, L. M. & Buchner, J. An unfolded CH1 domain controls the assembly and secretion of IgG antibodies. *Mol. Cell* **34**, 569-579, doi:10.1016/j.molcel.2009.04.028 (2009).
- 120 Lee, Y. K., Brewer, J. W., Hellman, R. & Hendershot, L. M. BiP and immunoglobulin light chain cooperate to control the folding of heavy chain and ensure the fidelity of immunoglobulin assembly. *Mol. Biol. Cell* **10**, 2209-2219, doi:10.1091/mbc.10.7.2209 (1999).
- 121 Mellahi, K., Brochu, D., Gilbert, M., Perrier, M., Ansorge, S., Durocher, Y. & Henry, O. Assessment of fed-batch cultivation strategies for an inducible CHO cell line. *J. Biotechnol.* **298**, 45-56, doi:10.1016/j.jbiotec.2019.04.005 (2019).
- 122 López-Meza, J., Araíz-Hernández, D., Carrillo-Cocom, L. M., López-Pacheco, F., Rocha-Pizaña Mdel, R. & Alvarez, M. M. Using simple models to describe the kinetics of growth, glucose consumption, and monoclonal antibody formation in naive and infliximab producer CHO cells. *Cytotechnology* **68**, 1287-1300, doi:10.1007/s10616-015-9889-2 (2016).
- 123 Bachhav, B., de Rossi, J., Llanos, C. D. & Segatori, L. Cell factory engineering: Challenges and opportunities for synthetic biology applications. *Biotechnol. Bioeng.* **120**, 2441-2459, doi:10.1002/bit.28365 (2023).
- 124 Kaneyoshi, K., Kuroda, K., Uchiyama, K., Onitsuka, M., Yamano-Adachi, N., Koga, Y. & Omasa, T. Secretion analysis of intracellular "difficult-to-express" immunoglobulin G (IgG) in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Cytotechnology* **71**, 305-316, doi:10.1007/s10616-018-0286-5 (2019).
- 125 Torkashvand, F., Vaziri, B., Maleknia, S., Heydari, A., Vossoughi, M., Davami, F. & Mahboudi, F. Designed amino acid feed in improvement of production and quality targets of a therapeutic monoclonal antibody. *PLoS One* **10**, e0140597,

- doi:10.1371/journal.pone.0140597 (2015).
- 126 Ha, T. K., Hansen, A. H., Kildegaard, H. F. & Lee, G. M. BiP Inducer X: an ER stress inhibitor for enhancing recombinant antibody production in CHO cell culture. *Biotechnol. J.* **14**, e1900130, doi:10.1002/biot.201900130 (2019).
 - 127 Dorner, A. J., Wasley, L. C. & Kaufman, R. J. Overexpression of GRP78 mitigates stress induction of glucose regulated proteins and blocks secretion of selective proteins in Chinese hamster ovary cells. *EMBO J.* **11**, 1563-1571, doi:10.1002/j.1460-2075.1992.tb05201.x (1992).
 - 128 Stolfa, G., Smonskey, M. T., Boniface, R., Hachmann, A. B., Gulde, P., Joshi, A. D., Pierce, A. P., Jacobia, S. J. & Campbell, A. CHO-omics review: the impact of current and emerging technologies on Chinese hamster ovary based bioproduction. *Biotechnol. J.* **13**, e1700227, doi:10.1002/biot.201700227 (2018).
 - 129 Baycin-Hizal, D., Tabb, D. L., Chaerkady, R., Chen, L., Lewis, N. E., Nagarajan, H., Sarkaria, V., Kumar, A., Wolozny, D., Colao, J., Jacobson, E., Tian, Y., O'Meally, R. N., Krag, S. S., Cole, R. N., Palsson, B. O., Zhang, H. & Betenbaugh, M. Proteomic analysis of Chinese hamster ovary cells. *J. Proteome Res.* **11**, 5265-5276, doi:10.1021/pr300476w (2012).
 - 130 Becker, J., Hackl, M., Rupp, O., Jakobi, T., Schneider, J., Szczepanowski, R., Bekel, T., Borth, N., Goesmann, A., Grillari, J., Kaltschmidt, C., Noll, T., Pühler, A., Tauch, A. & Brinkrolf, K. Unraveling the Chinese hamster ovary cell line transcriptome by next-generation sequencing. *J. Biotechnol.* **156**, 227-235, doi:10.1016/j.jbiotec.2011.09.014 (2011).
 - 131 Chong, W. P., Thng, S. H., Hiu, A. P., Lee, D. Y., Chan, E. C. & Ho, Y. S. LC-MS-based metabolic characterization of high monoclonal antibody-producing Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 3103-3111, doi:10.1002/bit.24580 (2012).
 - 132 Villiger, T. K., Steinhoff, R. F., Ivarsson, M., Solacroup, T., Stettler, M., Broly, H., Krismer, J., Pabst, M., Zenobi, R., Morbidelli, M. & Soos, M. High-throughput profiling of nucleotides and nucleotide sugars to evaluate their impact on antibody N-glycosylation. *J. Biotechnol.* **229**, 3-12, doi:10.1016/j.jbiotec.2016.04.039 (2016).
 - 133 Zhang, Y., Baycin-Hizal, D., Kumar, A., Priola, J., Bahri, M., Heffner, K. M., Wang, M., Han, X., Bowen, M. A. & Betenbaugh, M. J. High-throughput lipidomic and transcriptomic analysis to compare SP2/0, CHO, and HEK-293 mammalian cell lines. *Anal. Chem.* **89**, 1477-1485, doi:10.1021/acs.analchem.6b02984 (2017).
 - 134 Gao, Y., Ray, S., Dai, S., Ivanov, A. R., Abu-Absi, N. R., Lewis, A. M., Huang, Z.,

- Xing, Z., Borys, M. C., Li, Z. J. & Karger, B. L. Combined metabolomics and proteomics reveals hypoxia as a cause of lower productivity on scale-up to a 5000-liter CHO bioprocess. *Biotechnol. J.* **11**, 1190-1200, doi:10.1002/biot.201600030 (2016).
- 135 Lee, A. P., Kok, Y. J., Lakshmanan, M., Leong, D., Zheng, L., Lim, H. L., Chen, S., Mak, S. Y., Ang, K. S., Templeton, N., Salim, T., Wei, X., Gifford, E., Tan, A. H., Bi, X., Ng, S. K., Lee, D. Y., Ling, W. L. W. & Ho, Y. S. Multi-omics profiling of a CHO cell culture system unravels the effect of culture pH on cell growth, antibody titer, and product quality. *Biotechnol. Bioeng.* **118**, 4305-4316, doi:10.1002/bit.27899 (2021).
- 136 Lakshmanan, M., Kok, Y. J., Lee, A. P., Kyriakopoulos, S., Lim, H. L., Teo, G., Poh, S. L., Tang, W. Q., Hong, J., Tan, A. H., Bi, X., Ho, Y. S., Zhang, P., Ng, S. K. & Lee, D. Y. Multi-omics profiling of CHO parental hosts reveals cell line-specific variations in bioprocessing traits. *Biotechnol. Bioeng.* **116**, 2117-2129, doi:10.1002/bit.27014 (2019).
- 137 Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y. & Gu, J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* **34**, i884-i890, doi:10.1093/bioinformatics/bty560 (2018).
- 138 Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A. & Kingsford, C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat. Methods* **14**, 417-419, doi:10.1038/nmeth.4197 (2017).
- 139 Su, W., Sun, J., Shimizu, K. & Kadota, K. TCC-GUI: a Shiny-based application for differential expression analysis of RNA-seq count data. *BMC Res. Notes* **12**, 133, doi:10.1186/s13104-019-4179-2 (2019).
- 140 Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 27-30, doi:10.1093/nar/28.1.27 (2000).
- 141 Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A. H., Tanaseichuk, O., Benner, C. & Chanda, S. K. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat. Commun.* **10**, 1523, doi:10.1038/s41467-019-09234-6 (2019).
- 142 Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)* **57**, 289-300, doi:10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x (1995).
- 143 Dennis, G., Jr., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C. & Lempicki, R. A. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated

- discovery. *Genome Biol.* **4**, P3, doi:10.1186/gb-2003-4-9-r60 (2003).
- 144 Hosack, D. A., Dennis, G., Jr., Sherman, B. T., Lane, H. C. & Lempicki, R. A. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol.* **4**, R70, doi:10.1186/gb-2003-4-10-r70 (2003).
- 145 Carbon, S., Ireland, A., Mungall, C. J., Shu, S., Marshall, B. & Lewis, S. AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* **25**, 288-289, doi:10.1093/bioinformatics/btn615 (2009).
- 146 Chen, Y. & Betenbaugh, M. J. Reconstruction of reverse transsulfuration pathway enables cysteine biosynthesis and enhances resilience to oxidative stress in Chinese hamster ovary cells. *Metab. Eng.* **76**, 204-214, doi:10.1016/j.ymben.2023.02.010 (2023).
- 147 Ladiwala, P., Cai, X., Naik, H. M., Aliyu, L., Schilling, M., Antoniewicz, M. R. & Betenbaugh, M. J. Ala-Cys-Cys-Ala dipeptide dimer alleviates problematic cysteine and cystine levels in media formulations and enhances CHO cell growth and metabolism. *Metab. Eng.* **85**, 105-115, doi:10.1016/j.ymben.2024.07.008 (2024).
- 148 Jessop, L. & Lichten, M. Mus81/Mms4 endonuclease and Sgs1 helicase collaborate to ensure proper recombination intermediate metabolism during meiosis. *Mol. Cell* **31**, 313-323, doi:10.1016/j.molcel.2008.05.021 (2008).
- 149 Rusche, L. N., Kirchmaier, A. L. & Rine, J. The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 481-516, doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161547 (2003).
- 150 Capella Roca, B., Lao, N., Barron, N., Doolan, P. & Clynes, M. An arginase-based system for selection of transfected CHO cells without the use of toxic chemicals. *J. Biol. Chem.* **294**, 18756-18768, doi:10.1074/jbc.RA119.011162 (2019).
- 151 Chevallier, V., Schoof, E. M., Malphettes, L., Andersen, M. R. & Workman, C. T. Characterization of glutathione proteome in CHO cells and its relationship with productivity and cholesterol synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* **117**, 3448-3458, doi:10.1002/bit.27495 (2020).
- 152 Pendse, G. J., Karkare, S. & Bailey, J. E. Effect of cloned gene dosage on cell growth and hepatitis B surface antigen synthesis and secretion in recombinant CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 119-129, doi:10.1002/bit.260400117 (1992).
- 153 Reisinger, H., Steinfellner, W., Stern, B., Katinger, H. & Kunert, R. The absence of effect of gene copy number and mRNA level on the amount of mAb secretion from mammalian cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 701-710, doi:10.1007/s00253-008-1701-1 (2008).

- 154 Baik, J. Y. & Lee, K. H. A framework to quantify karyotype variation associated with CHO cell line instability at a single-cell level. *Biotechnol. Bioeng.* **114**, 1045-1053, doi:10.1002/bit.26231 (2017).
- 155 Dahodwala, H. & Lee, K. H. The fickle CHO: a review of the causes, implications, and potential alleviation of the CHO cell line instability problem. *Curr. Opin. Biotechnol.* **60**, 128-137, doi:10.1016/j.copbio.2019.01.011 (2019).
- 156 Vcelar, S., Jadhav, V., Melcher, M., Auer, N., Hrdina, A., Sagmeister, R., Heffner, K., Puklowski, A., Betenbaugh, M., Wenger, T., Leisch, F., Baumann, M. & Borth, N. Karyotype variation of CHO host cell lines over time in culture characterized by chromosome counting and chromosome painting. *Biotechnol. Bioeng.* **115**, 165-173, doi:10.1002/bit.26453 (2018).
- 157 Tsunoda, Y., Yamano-Adachi, N., Koga, Y. & Omasa, T. Sar1A overexpression in Chinese hamster ovary cells and its effects on antibody productivity and secretion. *J. Biosci. Bioeng.* **138**, 171-180, doi:10.1016/j.jbiosc.2024.05.003 (2024).
- 158 Mohan, C. & Lee, G. M. Effect of inducible co-overexpression of protein disulfide isomerase and endoplasmic reticulum oxidoreductase on the specific antibody productivity of recombinant Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* **107**, 337-346, doi:10.1002/bit.22781 (2010).
- 159 Ali, A. S., Raju, R., Kshirsagar, R., Ivanov, A. R., Gilbert, A., Zang, L. & Karger, B. L. Multi-omics study on the impact of cysteine feed level on cell viability and mAb production in a CHO bioprocess. *Biotechnol. J.* **14**, e1800352, doi:10.1002/biot.201800352 (2019).
- 160 Torres, M., McConnaughie, D., Akhtar, S., Gaffney, C. E., Fievet, B., Ingham, C., Stockdale, M. & Dickson, A. J. Engineering mammalian cell growth dynamics for biomanufacturing. *Metab. Eng.* **82**, 89-99, doi:10.1016/j.ymben.2024.01.006 (2024).
- 161 Torres, M., Akhtar, S., McKenzie, E. A. & Dickson, A. J. Temperature down-shift modifies expression of UPR-/ERAD-related genes and enhances production of a chimeric fusion protein in CHO cells. *Biotechnol. J.* **16**, e2000081, doi:10.1002/biot.202000081 (2021).
- 162 Mortazavi, M., Shokrgozar, M. A., Sardari, S., Azadmanesh, K., Mahdian, R., Kaghazian, H., Hosseini, S. N. & Hedayati, M. H. Using chemical chaperones to increase recombinant human erythropoietin secretion in CHO cell line. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **49**, 535-544, doi:10.1080/10826068.2018.1479865 (2019).
- 163 Grilo, A. L. & Mantalaris, A. The increasingly human and profitable monoclonal antibody market. *Trends Biotechnol.* **37**, 9-16, doi:10.1016/j.tibtech.2018.05.014

- (2019).
- 164 Bibila, T. & Flickinger, M. C. A structured model for monoclonal antibody
synthesis in exponentially growing and stationary phase hybridoma cells.
Biotechnol. Bioeng. **37**, 210-226, doi:10.1002/bit.260370304 (1991).
- 165 Bibila, T. A. & Flickinger, M. C. A model of interorganelle monoclonal antibody
transport and secretion in mouse hybridoma cells. *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 767-
780, doi:10.1002/bit.260380711 (1991).

学術論文発表

Tsunoda, Y., Yamano-Adachi, N., Koga, Y. & Omasa, T. Sar1A overexpression in Chinese hamster ovary cells and its effects on antibody productivity and secretion. *J. Biosci. Bioeng.* **138**, 171-180, doi:10.1016/j.jbiosc.2024.05.003 (2024). (第二章に関連)

Tsunoda, Y., Arishima, R., Boronina, T., Cole, R., Yamano-Adachi, N., Betenbaugh, M. & Omasa, T. Comparative omics profiling reveals differences in biomass, energy production, and vesicle transport between CHO and fast-growing CHL-YN cells. *Sci. Rep.* **15**, 39784, doi.org/10.1038/s41598-025-23503-z (2025). (第四章に関連)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、大変ご多忙な身であるにもかかわらず、自由に研究を行える素晴らしい環境を整えてくださり、また、暖かく適切なご指導、ご鞭撻を受け賜りました大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻 大政健史 教授に心より感謝申し上げます。

本博士学位論文を作成するにあたり、ご指導を受け賜りました、大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻 内山進 教授、ならびに渡邊肇 教授に厚く感謝申し上げます。

研究に対する姿勢や考え方に関して親身になってご指導を頂き、日ごろの些細な相談にも乗っていただいた大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻 山野範子 准教授、ならびに岡山理科大学工学部応用化学科 古賀雄一 教授に深く感謝申し上げます。3ヶ月間の留学を快く受け入れていただき、親身になってご指導を受け賜りました Johns Hopkins University、Department of Chemical and Biomolecular Engineering の Prof. Michael Betenbaugh に心より感謝申し上げます。本研究におけるプロテオミクス解析に関して多大なご援助をいただきました Johns Hopkins University School of Medicine、Mass Spectrometry and Proteomics Facility の Dr. Robert Cole、ならびに Dr. Tatiana Boronina に厚く感謝申し上げます。本研究で糖鎖解析を行うに際して、貴重なご意見をいただき、解析方法をご教示いただきました大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻 三崎亮 准教授をはじめとする藤山研究室の皆様感謝申し上げます。

研究活動および研究室生活においては、直属の先輩として研究の基礎と楽しさを教えていただきました桐本豊 修士、研究チームの後輩として常にチームを支えていただきました吉池知安留 修士、三苫周平 学士、柚谷篤紀 学士に心より感謝申し上げます。日頃の積極的な気遣いや物品の購入、書類の手配により研究生活を支えてくださいました金井貴蓉 特任助教、藤原直美 様、森本郁美 様、中野敬子 様、原田陽子 様、四方知子 様、高崎未来 様に厚く感謝申し上げます。技術的なご助言や言語に関するご助言をいただきました招へい研究員の皆様、研究やキャリアに関する多大なご助言をいただきました先輩方、日々、切磋琢磨しあいながら研究をともにした同期、いつも話し相手になってくださった後輩たち、研究室で関わった全ての方々に深く感謝申し上げます。アメリカでの研究や生活を支えていただきました Prof. Michael Betenbaugh の研究室の皆様にも深く感謝申し上げます。

なお、本研究は、本学の次世代挑戦的研究者育成プロジェクト J219713005、International Biomanufacturing Network (iBioNe) 2114716、日本学術振興会特別研究員奨励費 (DC2) 25KJ1736 の支援を受けたものです。

最後に、博士後期課程への進学を応援し、あらゆる面で支え続けてくれた家族、いつも激励の言葉をかけてくれた友人たちに深い感謝の意を評して謝辞といたします。