



Title	CHO細胞の組換え抗体生産性向上に寄与する新規細胞周期停止化合物の探索同定とその応用
Author(s)	城戸, 優英
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/82194
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (城 戸 優 英)

論文題名

CHO細胞の組換え抗体生産性向上に寄与する新規細胞周期停止化合物の探索同定とその応用

論文内容の要旨

抗体医薬の原薬であるモノクローナル抗体 (mAb) は主として組換えチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を用いた培養法によって生産される。抗体医薬の製造コストの高さは高額な薬価算定の一因にもなっている。製造コスト削減のためには効率的なmAb生産技術の開発が必要である。効率的生産技術の一つとして、細胞周期進行を阻害する化学薬剤を培地へ添加し、CHO細胞の細胞周期をG1期またはG2期で停止させる方法がある(以下、化学薬剤法と記す)。細胞周期停止によって細胞増殖は抑制されるが組換え抗体の比生産速度 (Qp) が向上し、それにより総生産量を向上することができる。化学薬剤法は使用が簡便であり工業応用しやすい利点があるが、効果に細胞株依存性があることが課題である。既存薬剤と異なる構造を持つ新たな細胞周期停止化合物は、既存薬剤では十分な効果が得られない細胞株に対しても有効に作用する可能性があり、化学薬剤法の細胞株依存性の課題解決に役立つと期待できる。本研究ではmAb生産性向上に有効な新たな細胞周期停止化合物を探索し、化学薬剤法への利用可能性を検証した。

第1章では、海洋由来微生物720株(放線菌400株、糸状菌320株)の培養抽出物から、CHO細胞のmAb生産性向上に有効な細胞周期停止化合物の候補を探索した。CHO細胞の細胞生存率を損なわずに細胞増殖阻害活性とmAb生産性向上効果を示した抽出物を選別し、分画処理によって目的の活性を示す画分(活性画分)を特定した。活性画分を液体クロマトグラフ質量分析に供して主成分を推定し、スタウロスポリンを含む6種の成分を推定主成分として得た。推定された主成分は活性画分の有効成分である可能性があり、化学薬剤法で使用する新たな細胞周期停止化合物(mAb生産性向上剤)として利用できる可能性がある。

第2章では、前章で得た推定主成分の一つであるスタウロスポリンについて、CHO細胞のmAb生産性や細胞周期への影響を評価した。アポトーシス誘導を生じない低濃度(2-4 nM)でのスタウロスポリン処理によって処理濃度依存的にCHO細胞の比増殖速度(μ)が低下し、Qpは向上した。細胞周期解析の結果、スタウロスポリン処理によるG1期停止誘導が μ 低下とQp向上に関連していると推測された。また処理濃度依存的に培養経過に伴う細胞生存率低下が抑制されており、細胞寿命の改善効果がみられた。Qp向上と細胞寿命改善によって培養液中の最大mAb濃度はコントロール比で5.2-16.3%向上した。スタウロスポリン処理による生産物品質(N-結合型糖鎖分布)への影響は観察されず、スタウロスポリンをCHO細胞のmAb生産性向上剤として利用できる可能性が示唆された。しかしながら、スタウロスポリン処理による抗体生産性向上効果は十分高いとは言えず、効果の改善が必要である。構造的類似性を有する化合物は生理活性も類似すると期待できるため、スタウロスポリン類縁体に着目したさらなる研究によってより高い効果を有する化合物を新たに得られると期待できる。そのため、次に構造類似化合物についてさらに検討した。

第3章では、スタウロスポリンと構造類似化合物であり多様な生理活性があるヴィオラセインについてmAb生産性向上剤としての有効性を評価した。スタウロスポリン処理と同様に、ヴィオラセイン処理によってCHO細胞の μ 低下、Qp向上および細胞寿命改善効果がみられた。ヴィオラセイン処理によって培養液中の最大mAb濃度はコントロール比で37.6%向上した。細胞周期解析の結果、ヴィオラセイン処理によりG1期とG2/M期で細胞周期停止が誘導されることが示された。ヴィオラセイン処理による抗体品質(N-結合型糖鎖分布および電荷多様性)への影響は見られず、スタウロスポリンと同様にヴィオラセインを新たなmAb生産性向上剤として利用できる可能性が示唆された。また、ヴィオラセインはスタウロスポリンよりも生産性向上効果が高く、より優れたmAb生産性向上剤になり得ると期待できた。

本研究によって、mAb生産性向上のための新しい細胞周期停止化合物としてスタウロスポリンおよびヴィオラセインが有効であることが示された。これらの化合物が哺乳類細胞の組換えタンパク質生産性へ与える影響を評価した例はなく、本研究が初めてである。本研究で見出された化合物は、化学薬剤法での使用が検討されている既知成分とは構造的に大きく異なる。細胞周期停止誘導のメカニズムも異なると期待でき、既存薬剤では効果が得られない細胞株に対しても有効な可能性がある。本研究結果は、化学薬剤法に使用可能な細胞周期停止化合物を新たに提案し、将来の効率的なバイオ医薬生産技術に資するものである。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (城戸 優英)	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 教授 大政 健史
	副 査 教授 内山 進
	副 査 教授 村中 俊哉
副 査 教授 本田 孝祐	

論文審査の結果の要旨

抗体医薬の原薬であるモノクローナル抗体 (mAb) は主として組換えチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を用いた培養法によって生産される。抗体医薬の製造コストの高さは高額な薬価算定の一因にもなっている。製造コスト削減のためには効率的な mAb 生産技術の開発が必要である。効率的生産技術の一つとして、細胞周期進行を阻害する化学薬剤を培地へ添加し、CHO 細胞の細胞周期を G1 期または G2 期で停止させる方法がある (以下、化学薬剤法と記す)。細胞周期停止によって細胞増殖は抑制されるが組換え抗体の比生産速度 (Q_p) が向上し、それにより総生産量を向上することができる。化学薬剤法は使用が簡便であり工業応用しやすい利点があるが、効果に細胞株依存性があることが課題である。既存薬剤と異なる構造を持つ新たな細胞周期停止化合物は、既存薬剤では十分な効果が得られない細胞株に対しても有効に作用する可能性があり、化学薬剤法の細胞株依存性の課題解決に役立つと期待できる。本研究では mAb 生産性向上に有効な新たな細胞周期停止化合物を探索し、化学薬剤法への利用可能性を検証している。

第 1 章では、海洋由来微生物 720 株 (放線菌 400 株、糸状菌 320 株) の培養抽出物から、CHO 細胞の mAb 生産性向上に有効な細胞周期停止化合物の候補を探索している。CHO 細胞の細胞生存率を損なわずに細胞増殖阻害活性と mAb 生産性向上効果を示した抽出物を選別し、分画処理によって目的の活性を示す画分 (活性画分) を特定している。活性画分を液体クロマトグラフ質量分析に供して主成分を推定し、スタウロスポリンを含む 6 種の成分を推定主成分として得ている。推定された主成分は活性画分の有効成分である可能性があり、化学薬剤法で使用する新たな細胞周期停止化合物 (mAb 生産性向上剤) として利用できる可能性がある。

第 2 章では、前章で得た推定主成分の一つであるスタウロスポリンについて、CHO 細胞の mAb 生産性や細胞周期への影響を評価している。アポトーシス誘導を生じない低濃度 (2-4 nM) でのスタウロスポリン処理によって処理濃度依存的に CHO 細胞の比増殖速度 (μ) が低下し、 Q_p は向上している。細胞周期解析の結果、スタウロスポリン処理による G1 期停止誘導が μ 低下と Q_p 向上に関連していると推測されている。また処理濃度依存的に培養経過に伴う細胞生存率低下が抑制されており、細胞寿命の改善効果がみられている。 Q_p 向上と細胞寿命改善によって培養液中の最大 mAb 濃度はコントロール比で 5.2-16.3%向上している。スタウロスポリン処理による生産物品質 (N -結合型糖鎖分布) への影響は観察されず、スタウロスポリンを CHO 細胞の mAb 生産性向上剤として利用できる可能性が示唆されている。しかしながら、スタウロスポリン処理による抗体生産性向上効果は十分高いとは言えず、効果の改善が必要である。構造的類似性を有する化合物は生理活性も類似すると期待できるため、スタウロスポリン類縁体に着目したさらなる研究によってより高い効果を有する化合物を新たに得られると期待できる。そのため、次に構造類似化合物についてさらに検討している。

第 3 章では、スタウロスポリンと構造類似化合物であり多様な生理活性があるヴィオラセインについて mAb 生産性向上剤としての有効性を評価している。スタウロスポリン処理と同様に、ヴィオラセイン処理によって CHO 細胞の μ 低下、 Q_p 向上および細胞寿命改善効果がみられている。ヴィオラセイン処理によって培養液中の最大 mAb 濃度はコントロール比で 37.6%向上している。細胞周期解析の結果、ヴィオラセイン処理により G1 期と G2/M 期で細胞周期停止が誘導されることが示されている。ヴィオラセイン処理による抗体品質 (N -結合型糖鎖分布および電荷多様性) への影響は見られず、スタウロスポリンと同様にヴィオラセインを新たな mAb 生産性向上剤として利用できる可能性が示唆

されている。また、ヴィオラセインはスタウロスポリンよりも生産性向上効果が高く、より優れた mAb 生産性向上剤になり得ると期待できる。

本研究によって、mAb 生産性向上のための新しい細胞周期停止化合物としてスタウロスポリンおよびヴィオラセインが有効であることが示されている。これらの化合物が哺乳類細胞の組換えタンパク質生産性へ与える影響を評価した例はなく、本研究が初めてである。本研究で見出された化合物は、化学薬剤法での使用が検討されている既知成分とは構造的に大きく異なる。細胞周期停止誘導のメカニズムも異なると期待でき、既存薬剤では効果が得られない細胞株に対しても有効な可能性がある。

以上のように、本論文は化学薬剤法に使用可能な細胞周期停止化合物を新たに提案し、将来の効率的なバイオ医薬生産技術に資するものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。