



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

博士学位論文

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

城戸 優英

2021 年 1 月

大阪大学大学院工学研究科

目次

序論.....	5
第 1 節 研究背景.....	5
第 2 節 博士論文構成.....	16
第 1 章 海洋由来微生物の培養抽出物からの候補化合物探索	18
第 1 節 緒言.....	18
第 2 節 実験材料及び実験方法	21
(1) 細胞株及び培地	21
(2) 継代培養条件	21
(3) 海洋由来微生物の培養液抽出物	22
(4) 微生物培養液抽出物の CHO 細胞増殖阻害率算出	22
(5) μ に対する 50%阻害濃度の算出.....	23
(6) 微生物培養抽出物による CHO 細胞の Q_p と細胞生存率への影響評価	24
(7) オープンカラムを用いた粗分画処理及び画分評価.....	25
(8) HPLC による細分画処理	26
(9) 増殖阻害活性を示す HPLC 活性画分の特定	27
(10) マススペクトル解析	27
第 3 節 結果.....	29
(1) 微生物培養抽出物の CHO 細胞に対する増殖阻害及び Q_p 向上効果	29
(2) 活性画分の特定	31
(3) 活性画分の主成分解析	34
第 4 節 考察.....	40
第 5 節 小括.....	42
第 2 章 スタウロスポリンの mAb 生産性向上効果の検証	43
第 1 節 緒言.....	43

第2節 実験材料及び実験方法	46
(1) 細胞株及び使用培地	46
(2) 継代培養条件	46
(3) バッチ培養	46
(4) フェドバッチ培養	47
(5) VCD、細胞生存率、および IgG 濃度測定	47
(6) カスパーゼ 3/7 活性の評価	47
(7) 培養液成分解析	48
(8) IgG 抗体の N 結合型糖鎖解析	48
(9) 細胞周期解析	49
(10) 統計解析	50
第3節 結果	51
(1) スタウロスポリン有効処理濃度の設定	51
(2) スタウロスポリン処理による細胞増殖性と IgG 生産性への影響	53
(3) CHO 細胞の代謝への影響	56
(4) IgG 抗体の N 結合型糖鎖分布への影響	57
(5) CHO 細胞の細胞周期分布に及ぼすスタウロスポリン処理の影響	60
第4節 考察	62
第5節 小括	68
第3章 ヴィオラセインの mAb 生産性向上剤としての有効性評価	70
第1節 緒言	70
第2節 実験材料及び実験方法	74
(1) 細胞株、使用培地および継代培養条件	74
(2) ヴィオラセインの調製	74
(3) バッチ培養	74

(4) フェドバッチ培養	75
(5) VCD、細胞生存率、および IgG 濃度測定	75
(6) カスパーゼ 3/7 活性の評価	75
(7) 培養液成分解析	75
(8) IgG 抗体の N 結合型糖鎖解析	76
(9) 電荷多様性解析	76
(10) IgG mRNA 量測定	77
(11) 細胞周期解析	78
(12) 統計解析	78
第 3 節 結果	79
(1) CHO 細胞に対するヴィオラセインの用量依存的影響	79
(2) ヴィオラセイン処理による細胞増殖性と IgG 生産性への影響	81
(3) CHO 細胞の代謝への影響	83
(4) ヴィオラセイン処理による CHO 細胞の細胞周期への影響	84
(5) IgG mRNA 転写レベルへの影響	85
(6) IgG 抗体の N 結合型糖鎖分布への影響	86
(7) IgG 抗体の電荷多様性への影響	88
第 4 節 考察	91
第 5 節 小括	98
第 4 章 総括	99
第 1 節 博士論文まとめ	99
第 2 節 今後の研究への期待	101
補足資料	105
参考文献	108
関連論文	130

謝辭.....	131
---------	-----

序論

第 1 節 研究背景

1986 年、アメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration, FDA) が初めての抗体医薬として CD3 特異的モノクローナル抗体であるムロモナブ (販売名 Orthoclone OKT3; Janssen-Cilag 社) を承認して以降 (日本では 1991 年に承認)、抗体医薬はガン、自己免疫疾患、炎症性疾患などの様々な疾患の治療に広く用いられるようになった (1)。抗体医薬とは、異物に対する防御反応として生体内で作られる抗体を人工的に大量生産して医薬品として使用できるようにしたものである。抗体医薬には、標的に対する高い選択性、少ない副作用、高い生体内安定性などの従来の低分子医薬にはない様々な利点があり、ガンや自己免疫疾患といった低分子医薬では不十分な治療領域に対しても有効である。そのため、現代社会において抗体医薬の医療的価値は極めて高い。

この医療的重要性から抗体医薬品の市場は成長の一途をたどっており、製薬企業にとってその開発の成否は企業収益において重要な意味を持つ。EvaluatePharma 社の調査によれば、全世界の処方箋薬と市販薬の売上の中でバイオテクノロジーを活用した医薬品 (バイオ医薬品) の売上が占める割合は、2010 年では 18%であったのに対して 2018 年では 28%まで増加しており、さらに 2024 年には 32%まで増加するとの予測がなされている (2)。この売上比率の増加は、医薬品業界において抗体医薬を含むバイオ医薬品の重要度が年々増していることを示す。このバイオ医薬品の売上には抗体医薬の売上が特に大きく寄与している。抗体医薬の承認数は年々増えており (3)、1 剤の売上が年間 10 億米ドルを超えるブロックバスターと呼ばれる製品に育つ品目も多い。なお、2018 年の世界医薬品売上の上位 10 位以内に入る抗体医薬品は 6 品目にも及ぶ (4)。近年ではバイオ医薬分野において、細胞治療や遺伝子治療などの新しい治療法や治療薬が開発されてきているものの、今後も抗体医薬がバイオ医薬品の主流となり続けると予想されている (5)。

このような医療的および経済的価値から、抗体医薬に関する技術領域は重要な研究対象となっている。現在、ムロモナブの承認から既に 30 年以上が経過しているが、今でもなお積極的に抗体医薬についての研究開発が世界各地で進行しており、多くの研究者の注目を集めている。近年の抗体医薬における研究成果として、次世代抗体（バイスペシフィック抗体、抗体薬物複合体、リサイクリング抗体など）の開発が挙げられる。次世代抗体は既存の抗体にない新しい作用メカニズムとターゲット戦略を有し、抗体医薬の適用範囲拡大に貢献している (6)。

また、連続生産技術の開発に挙げられるような、製造工程に対する新技術の開発も進んでいる。抗体医薬の製造工程は大きく 2 つの工程、すなわち細胞培養法による目的タンパク質の生産工程であるアップストリーム工程と、タンパク質の精製及び原薬への加工工程であるダウンストリーム工程に分けられる (7)。抗体医薬製造では、従来は両方においてバッチ式の工程が主流であったが、いずれも連続生産に対応した工程が開発されつつある (7,8)。連続生産技術は抗体医薬の製造コスト削減に寄与すると期待されている。抗体医薬によるガン治療費の高さは、低所得国や中所得国だけでなく、高所得国の医療システムにとっても問題となっており、その薬価低減は重要課題である (9)。類似薬がない場合の新薬の薬価は原価計算方式で算定されるため、製造コスト削減によって今後新たに開発される抗体医薬の薬価低減が期待できる。連続生産技術が製造コスト削減ほどの程度寄与するかは、実際には生産量に依存する部分は大きいものの、Biopharm Services 社の発表事例では年間生産量 100–500kg の場合、アップストリームとダウンストリームの両方を連続生産工程に変更することによって抗体 1g あたりの製造コストが従来のバッチ式工程と比較して 32–33%削減されると試算されている (10)。

また、連続生産技術は生産物品質の向上にも寄与する。現在の医薬製造現場におけるアップストリーム工程ではバッチ式培養法的一种であるフェドバッチ培養法が主流であるが、この手法では細胞増殖に伴う栄養成分の消費や代謝副産物の蓄積などによって、培養槽内の環境は経時的に変化する。一方、連続生産に適した細胞培養法として着目されているパフュージョン培養法では、連続的な培地供給と副産物除去によって定常状態を保つことができるため、培養環境を長期的に安定して維持することが可能である (7)。これにより生産物品質

に対してより好ましい影響がもたらされると期待できる (11)。以上のような、次世代抗体医薬および製造工程に関する新しい技術開発は抗体医薬品のより一層の普及と適用範囲拡大に寄与し、その医療的および経済的重要性を今後もますます押し上げるものと期待できる。

抗体医薬の原薬であるモノクローナル抗体 (monoclonal antibody, mAb) は、主としてチャイニーズハムスター卵巢 (Chinese hamster ovary, CHO) 細胞を用いた培養法により工業的に製造されている。2019 年 5 月 1 日までに日米欧で承認された抗体医薬品全 84 製品のうち、54 製品 (64.3%) は CHO 細胞を生産宿主としている (12)。CHO 細胞は Puck らによって樹立された細胞株である (13)。糖鎖付加や適切なフォールディングなどの翻訳後修飾能を持ち複雑な構造の治療用タンパク質を生産できるため、mAb を含む様々な治療用タンパク質製造のための生産宿主として適している (14)。また、CHO 細胞は無血清培地に馴化させることで浮遊性細胞としても培養できるため、工業的な大容量タンクを用いた培養も可能である。

抗体に代表される組換えタンパク質生産性の向上は製造コストを削減し、設備効率を向上させるため (15)、様々な側面から技術開発が進められている。先に述べた連続生産技術もその一例である。アップストリーム工程の生産性向上においては生産株、培地、培養装置及び培養制御法のいずれかに関連したアプローチがとられる。一例として、遺伝子組換え技術による高生産株構築、細胞株の栄養成分消費及び有害代謝副産物産生を考慮した培地配合設計、せん断ストレスを防ぎ効率的な酸素供給を可能にする攪拌翼及び培養槽の構造設計、または培養データモニタリングとフィードバック制御による培養条件自動制御法の開発などがあり、これらには既に実用化された技術も多い。実用化されている技術の多くは細胞にとって好ましい培養状態を維持し、増殖促進的に作用することによって組換えタンパク質生産性を向上するものである。一方、未だ使用は限られているものの、増殖阻害的に作用することによって生産性を向上するアプローチもある。

培養生産における組換えタンパク質の生産物濃度 (P) は次式 1) で示すことができ、生細胞密度 (viable cell density, VCD)、比生産速度 (Q_p)、および培養期間 (t) と直接的に関与している。

$$P = Q_p \int VCD dt \quad \text{式 1)}$$

生産物濃度の上昇は同一スケールで培養した際の生産物量を向上し、従って設備利用効率や製造人員あたりの生産効率を向上させる。前述した増殖促進的アプローチは VCD 向上および／または培養可能期間の延長によって生産物濃度を上昇させる。一方、増殖阻害的アプローチでは Q_p 向上によって生産物濃度を上昇させる。

増殖阻害的アプローチは哺乳類細胞のタンパク質生産性が細胞周期依存的であることを利用する。Figure 1 に示すように細胞は主に 4 つの細胞周期、すなわち G1 期、S 期、G2 期および M 期を一方向に進みながら分裂し、増殖する。G1 期ではリボソームの生合成やタンパク質翻訳に関わる遺伝子などタンパク質合成に関わる因子が高度に発現する (16)。CHO 細胞の組換えタンパク質の発現には CMV (Cytomegarovirus) プロモーターなどの強力な構成的プロモーターが使われることが多く、タンパク質生合成に関わる因子の発現向上により組換えタンパク質の発現も向上すると期待できる。そのため、何らかの手段により細胞周期進行を制御して G1 期での滞在時間を延ばすことで、そうでない状態よりも Q_p を向上させることができる (16,17)。なお、この増殖阻害的アプローチは完全に細胞周期を停止させるのではなく、あくまである特定の細胞周期での滞在時間を通常よりも延ばすことを意図するものであるが、当該研究分野では細胞周期停止 (cell cycle arrest) と表現されることが多いため、本博士論文においてもこのアプローチに基づく技術を細胞周期停止技術と記載する。細胞周期停止による組み換えタンパク質の Q_p 向上についての既存研究は G1 期停止誘導に基づく事例が多い (16,17)。しかしながら、一般的には G1 期と同様に G2 期もタンパク質の生産性が高まることが知られており、研究例は少ないものの G2 期停止による組換えタンパク質の Q_p 向上効果も報告されている (18)。G1 期では DNA 複製に関与する酵素群など次の S 期で必要とされるタンパク質が主に合成され、一方、G2 期では微小管などの有糸分裂に必要なタンパク質が多く合成される。G2 期停止による Q_p 向上のメカニズムは十分解明されていないが、G1 期停止と

同様にタンパク質生合成因子の発現向上が寄与したものと考えられる。また、低温処理による細胞周期停止誘導などの一部の手法においては、 Q_p 向上に加えて細胞寿命改善による培養可能期間延長も期待できる。この理由としては、低温条件下での細胞分裂速度および代謝速度の低下により培地成分消費量や乳酸／アンモニア産生量が減少したこと、またせん断力やアポトーシス促進因子への感受性が低下したことなどが要因と考えられている (16, 17)。

細胞周期停止技術では、細胞分裂に要する時間を延長するために比増殖速度 (μ) の低下を伴う。 μ の低下は VCD を減少させ、生産性には負の効果をもたらすが、 Q_p 向上及び培養可能期間延長による正の効果が負の効果を上回った場合、生産物濃度を上昇させることができる。

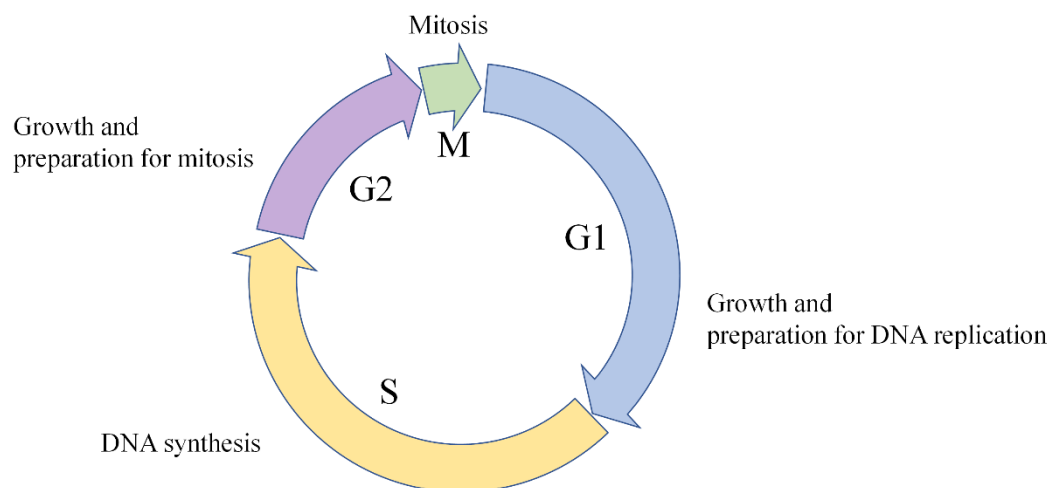


Fig. 1. Phases of the cell cycle.

The figure was created with reference to Ref. (19).

細胞周期制御はフェドバッチおよびパフュージョン培養法の両方において、生産性向上に有効である。一般的にフェドバッチ培養法において、高い VCD の達成は効率的なタンパク質生産に有効であるが、最適な VCD 以上の過度な増殖はダウンストリーム工程の負荷を増大して生産物損失を増やしてしまうために収率低下の要因となる (20)。ダウンストリーム工程での負荷を一定範囲内に抑えながら培養槽あたりの生産量を最大化するためには、過度な細胞増殖を防ぎつつ、 Q_p を向上させることが有効であり、その目的において細胞周期停止技術は

有用である。

パフュージョン培養法においても、過度な細胞増殖は生産物損失の増加と生産効率低下を引き起こす。パフュージョン培養法では、フェドバッチ培養法よりも高い VCD で、長期間連続的に培養可能である (7)。フェドバッチ培養法とは異なり、パフュージョン培養法では培養装置側に膜分離や遠心分離などの細胞分離装置が付随するため、パフュージョン培養法の回収液には細胞は含まれていない。この培養法で細胞過増殖が問題となるのはダウンストリーム工程ではなく、主にアップストリーム工程においてである。細胞密度の増加は、培養液粘度や酸素要求量を増加させる。過度な細胞増殖の結果、膜目詰まりやポンプ能力限界による細胞分離機能低下、また酸素枯渇による細胞ストレスや細胞死が生じる (11, 21, 22)。それ故、目的とする VCD を維持するために、パフュージョン培養法では細胞の排出工程であるセルブリーディングと呼ばれる処理が実施される。しかしながら、セルブリーディング処理は細胞と同時に生産物も排出してしまうため、生産量の低下をもたらす。一般的なセルブリーディング速度はパフュージョン速度の 10–30% にもなるが (23)、プロセスの複雑化を避けるために今までのところブリード排出液に含まれる生産物を回収することはなされていない (24)。セルブリーディングに伴う生産物ロスを低減するためには、ブリード排出量を最小限に留める必要があり、その方策として細胞周期停止技術の利用が検討されている (24, 25)。Wolf らの研究では、低温条件 (33.0°C) による細胞周期停止によってコントロール条件 (36.5°C) よりもブリード速度が 0.36 反応槽容量 (reactor volume, RV) day⁻¹ から 0.10–0.20 RV day⁻¹ に減少し、その結果として生産物損失量が 26.0% から 10.6% に低下した (25)。また、培地中の Na⁺ と K⁺ 濃度調整による細胞周期停止によって、総ブリード量が 50% 以上削減されたとの報告もある (24)。また、細胞周期の停止による Q_p 向上効果は回収液の生産物濃度増加に寄与する。細胞周期停止によって期待される効果、すなわち VCD 減少と Q_p 向上はいずれもパフュージョン培養法の要求事項と良く合致する。以上のような背景から細胞周期停止技術は効率的な mAb 生産のために役立つと期待されている。

細胞周期停止を引き起こす手法は様々であるが、特に良く検討されているのは低温培養法、

遺伝子工学的手法、及び化学薬剤法の3つである (16, 17)。これらの手法にはそれぞれ現状で解決されていない固有の課題があるため、今日に至るまで標準的な手法として確立されたものはない。

低温培養法は、哺乳類細胞の一般的な培養温度である 37°C よりも低い温度 (28–35°C) で細胞培養する方法である。低温にすることにより CHO 細胞の細胞周期は G1 期で停止し、組換え抗体をはじめ、エリスロポエチンや分泌型アルカリホスファターゼなどの種々の組換えタンパク質の生産性が向上する (26–28)。低温培養法は、培養ステージを二相に分けた温度シフトと呼ばれる戦略で用いられることが多い。温度シフト戦略では、培養初期は 37°C で活発に細胞増殖させ、その後に培養温度を低温 (28–35°C) に変化させることで増殖を抑えて目的タンパク質を効率的に生産させることができる (16, 29)。低温条件が細胞周期や組換えタンパク質の生産性向上に寄与するメカニズムは未だに十分解明されていないが、CIRP などの低温誘導タンパク質の関与や (30)、p53 および p21 の発現量増加 (31, 32)、また目的遺伝子の転写促進や mRNA 安定性の向上による影響などが示唆されている (27, 33–35)。低温培養法の課題としては、効果の細胞株依存性や糖鎖構造への影響が指摘されている (20, 26, 27, 36)。Yoon らにより、同一の CHO 細胞株を宿主としても、生産するタンパク質の種類の違いによって低温条件下で生産性が向上する場合としない場合があることが報告された (26, 27)。Kim らの研究では同じ親株からクローニングされた細胞株の間においてすら、低温条件が組換えタンパク質生産性に対して与える影響に違いがあることが報告された (36)。また、Du らの研究では、36°C から 30°C への培養温度低下によって末端ガラクトース付加型の N 結合型糖鎖 (G1F 及び G2F) の比率が減少し、ハイマンノース型糖鎖の比率が上昇した。Du らはマイクロアレイ解析法を用いて、低温条件下では N 結合型糖鎖合成経路に含まれる多くの酵素群とトランスポーターの mRNA 転写レベルが有意に低下することを示し、低温条件下では不完全な糖鎖修飾が起こることが示唆された。

遺伝子組換えによって、細胞周期調節に関与する遺伝子を過剰発現することでも細胞周期を停止可能である。遺伝子工学的手法による過剰発現では p21 と p27 がターゲットになるこ

とが多い。サイクリン依存性キナーゼ (cyclin dependent kinase, CDK) は細胞周期移行のための重要な因子である。p21 と p27 はサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 (cyclin dependent kinase inhibitor, CKI) であり、CDK 活性を阻害する。p21 と p27 の発現量向上により G1 期での細胞周期停止が誘導され、抗体を含む様々な組換えタンパク質の生産性が向上する (37–39)。遺伝子工学的手法の課題は効果の細胞株依存性、変異株出現リスク、および構築済みの既存生産株には適用できない点である。この手法は株特異的なアプローチであり、遺伝子不安定性の課題、すなわち導入遺伝子の変異や欠失、エピジェネティックな変化によるサイレンシングといった課題に対応する必要がある (40)。遺伝子組換えによって導入した遺伝子の変異や欠失などによって増殖阻害効果が消失した変異株が出現した場合、変異株は他の細胞よりも培養槽内で優先的に増殖する。そのため、やがて変異株が細胞集団を占有することとなり培養槽あたりの生産性は低下する。また、医薬品承認申請に用いられた医療用タンパク質生産株に対して新たに遺伝子改変をすることは、細胞基材の変更を意味するため現実的な手段ではない。バイオ医薬の製法変更をする際は、ICH Q5E ガイドライン「生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品) の製造工程の変更にとまなう同等性／同質性評価」(41) に従った同等性／同質性評価が必要となるが、細胞基材は製造工程最上流の管理項目に位置するため、その変更によって安全性や有効性に悪影響を生じる可能性を否定できない。このような場合、膨大な時間と費用を要する非臨床試験や臨床試験のやり直しの必要性が生じてしまうため、既存生産株に対してはこの技術の採用ハードルは極めて高い。

細胞周期調節に影響する化学物質を培養液に添加することによっても細胞周期を停止させることができる。この手法で用いる化学薬剤として、酪酸ナトリウム (Sodium butyrate, NaBu) やバルプロ酸などの短鎖脂肪酸類の使用が主として検討されている (15, 42, 43)。短鎖脂肪酸類はクラス I およびクラス II のヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase, HDAC) の活性サイトにある亜鉛原子をキレートすることによって、HDAC 活性を阻害する (44–46)。HDAC 活性阻害によって、CKI である p21 および p27 の近傍プロモーター領域の H3K9 アセチル化レベルが上昇し、遺伝子転写量が増加する (47)。また、NaBu は哺乳類細胞に対して網

膜芽細胞腫タンパク質 (retinoblastoma protein, pRB) のリン酸化阻害や、CDK2、CDK4 および CDK6 の発現量低下をもたらすことも報告されている (48, 49)。このような作用により、短鎖脂肪酸類は CHO 細胞を含む様々な細胞種に対して G1 期での細胞周期停止を誘導する (17, 42, 47)。化学薬剤法の課題は、用いる化学物質の細胞毒性による培養可能期間の短縮と効果の細胞株依存性である。NaBu は短鎖脂肪酸類の中でも、タンパク質生産性向上剤として特に良く研究されているが (50–53)、細胞周期停止後にアポトーシス細胞死を引き起こして細胞寿命を低下させるため、タンパク質の総生産量向上に寄与しない場合もある (54, 55)。また、NaBu とバルプロ酸を用いた研究にて組換えタンパク質生産性に与える影響が株依存であることが報告されており、化学薬剤法においても他の 2 手法と同様に効果の細胞株依存性が課題となっている (15, 56)。

本研究では、細胞周期停止のための上記 3 つの手法のうち、化学薬剤法に着目した。工業的 mAb 製造工程への応用という観点では、上記 3 手法のうち実用可能性が高いのは、低温培養法と化学薬剤法である。遺伝子工学的手法は、その複雑性および遺伝的不安定性のために工業的プロセスには使用されていない (18)。低温培養法と化学薬剤法は操作が簡便であり、工業的プロセスへの適用が容易である。特に低温培養法は簡便性においては化学薬剤法よりも優れている。操作パラメーターが温度条件と温度変更タイミングの 2 因子しかなく、培養装置の運転条件変更のみで対応できるためである。しかしながら、前述のように低温培養法の効果には細胞株依存性があり、低温条件で生産性向上が見込めない株については適用できない。操作パラメーターの少なさは、表現を変えれば改良余地が少ないとも言える。一方、化学薬剤法では使用する化合物の種類、添加濃度、使用タイミング及び複数成分の組み合わせなど、操作可能なパラメーターは多い。CHO 細胞の異種タンパク質生産性向上のために、過去、短鎖脂肪酸類を含め、ピリドピリミジン類化合物、塩化リチウム、エピガロカテキンガレートなどのいくつかの細胞周期停止化合物の使用が提案されている (15, 18, 20, 42, 50, 51, 57)。しかしながら、世の中に存在する化合物の種類の豊富さを考慮すると、化学薬剤法による組換えタンパク質生産性向上効果の検証がなされた物質は未だ限定的であり、多くの検討

余地が残されている。

化学薬剤法の効果の細胞株依存性は、CHO 細胞の遺伝的及び表現型多様性に起因する可能性がある。CHO 細胞は異数性の細胞であり、遺伝子変異を起こしやすく遺伝的多様性を生じやすい (58, 59)。さらに、CHO 細胞では多くの遺伝子が機能的に半接合な状態となっていることも示唆されており (60)、生じた遺伝子変異が表現型の変化として現れやすい。これらの遺伝的及び表現型多様性のために、化合物に対する感受性は株ごとに種々異なると考えられる。同一の親株由来であったとしても生産株構築の過程で化合物感受性が変化することも想定でき、同じ親株から作成した子株同士でも化合物が与える効果に違いが生じると推測できる。

CHO 細胞のタンパク質生産性向上のための細胞周期停止化合物の種類拡充は、化学薬剤法の細胞株依存性の課題を解決する方策の一つである。CHO 細胞の遺伝的及び表現型多様性を考慮すると、全ての CHO 細胞株に対して万能的／汎用的に使用可能な化学薬剤を見出せる可能性は低い。一方、化合物の種類拡充により選択の幅が広がれば、個々の細胞株に最適な化合物を任意に選択できる余地を生む。細胞株に適した化合物および使用条件が任意に選択できるようになれば、個別の株に対しての最適な生産条件をオーダーメイドで組むことも可能となり、より効率的な生産技術に繋がると期待できる。

上記背景に基づき、本研究は CHO 細胞の mAb 生産性、具体的には IgG1 の生産性向上に有効な新規の細胞周期停止化合物の探索と化学薬剤法への利用可能性の検証を研究課題とした。なお、IgG には 4 つのサブクラスがあるが、抗体医薬原薬としては IgG1 型の mAb が主として用いられている。国立医薬品食品衛生研究所による取りまとめでは、2019 年 5 月 1 日までに日米欧で承認された抗体医薬品 84 製品のうち、IgG1 型の mAb を原薬としている製品は全体の 66.7%を占める (56 製品) ことが報告されている (12)。

本研究成果は、化学薬剤法で使用可能な新たな有効成分の発見と、その成分を用いた効率的な mAb 生産技術の開発に寄与する。本成果は CHO 細胞を用いた mAb 培養生産法に使用可能な薬剤の選択の幅を増やし、短鎖脂肪酸類など従来の化合物では期待する効果が得られな

い株に対する代替選択先を提案する。また、既知化合物で既に効果が得られている細胞株に対しても、新規化合物ではさらに高い効果、高い安全性または使用容易性が達成できる可能性もある。よって、現状の化学薬剤法の課題解決及び技術改善のための一助となり、バイオ医薬生産技術の向上に資するものである。

第2節 博士論文構成

本博士論文は、新規細胞周期停止化合物の探索と化学薬剤法への利用可能性の検証を研究課題とし、第1章から第3章に渡る3つの研究で構成される。第1章では海洋由来微生物の培養抽出物を探索源としたスクリーニング試験を実施し、mAb生産性向上効果が期待できる細胞周期停止化合物の候補を得た。第2章では、第1章で得られた候補化合物の一つであるスタウロスポリンについて、細胞周期への影響を評価し、mAb生産性向上剤としての利用可能性を検証した。第3章では、スタウロスポリンと構造的類似性を持つヴィオラセインについて、さらに詳細にmAb生産性向上剤としての効果を評価し、その有効性を確認した。スタウロスポリン、ヴィオラセイン共にCHO細胞の異種タンパク質生産性に関する報告例はなく、本研究が初めての知見となる。最後に、第4章では第1章から第3章までの内容をまとめると共に、今後の研究の発展性について論じた。

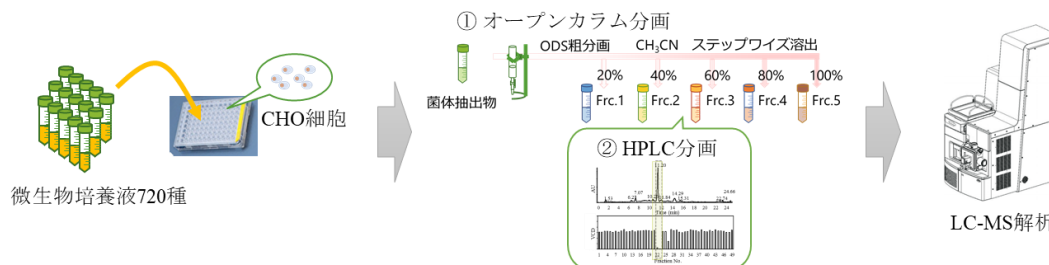
本博士論文研究における第1章から第3章の各章研究の位置づけを次項に示す。

博士論文の目的

CHO細胞のmAb生産性向上に有効な新規細胞周期停止化合物の探索と化学薬剤法への利用可能性の検証

第1章：海洋由来微生物の培養抽出物からの候補化合物探索

【細胞培養評価による有効抽出物選別】 【カラム分画処理及び活性画分特定】 【活性画分中の主成分推定】



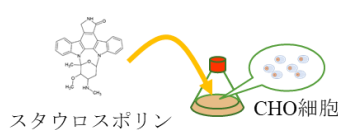
結果：細胞増殖阻害活性とmAb生産性向上効果を示した4つの活性画分の主成分を推定し、各画分の有効成分(活性化化合物)の候補とした

課題：第1章研究では活性化化合物候補の選定のみに留まり、候補化合物の効果は未検証

候補化合物の効果実証が必要

第2章：活性化化合物候補の一つであるスタウロスポリンのmAb生産性向上効果の検証

【スタウロスポリン処理によるCHO細胞の増殖性、抗体生産性等への影響評価】



評価項目

- ・細胞増殖性
- ・細胞代謝
- ・抗体品質
- ・抗体生産性
- ・細胞周期

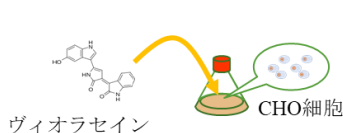
結果：スタウロスポリン処理は細胞周期停止を誘導し、生産物品質に影響せずにmAb生産性を向上
mAb生産性向上剤としての利用可能性を示唆

課題：スタウロスポリンには、抗体生産性のさらなる向上などのいくつかの改善すべき課題がある

スタウロスポリン類縁体に研究範囲を広げることで、生産性向上により有効な化合物を見出せる可能性

第3章：スタウロスポリン構造類似化合物であるヴィオラセインのmAb生産性向上剤としての有効性評価

【ヴィオラセイン処理によるCHO細胞の増殖性、抗体生産性等への影響評価】



評価項目

- ・細胞増殖性
- ・細胞代謝
- ・抗体品質
- ・抗体生産性
- ・細胞周期
- ・抗体遺伝子発現量

結果：ヴィオラセイン処理は細胞周期停止を誘導し、抗体品質に影響せずにmAb生産性を向上
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生産性向上剤として
利用できる可能性が示唆

博士論文の成果

CHO細胞の組換えmAb生産性向上に有効な新規の細胞周期停止化合物として、スタウロスポリンおよびその類縁体であるヴィオラセインを新たに見出し、化学薬剤法に利用可能であることを示した

第 1 章 海洋由来微生物の培養抽出物からの候補化合物探索

第 1 節 緒言

この章では、化学薬剤法の有効成分として使用可能な、新たな細胞周期停止化合物の候補を探索するため、mAb 生産性向上効果と細胞増殖阻害効果を有する化合物のスクリーニングを実施した。スクリーニングの探索源としては、海洋由来の放線菌及び糸状菌の培養抽出物を用いた。なお本章研究にて化合物ライブラリーではなく、微生物の培養抽出物を探索源とした理由は見出した成分の工業的生産実現性を重視したためである。工業スケールでの微生物培養技術は既にほぼ確立された技術であり、また有機溶媒抽出法および／またはクロマト精製法によって生産物の高純度精製も比較的容易である。微生物の生産物は共通性のある製造プラットフォームで生産可能であり、目的物探索後の生産実現性という点において個々別々に生産方法を検討する必要がある化合物ライブラリーからの探索よりも優れていると期待できる。

放線菌や糸状菌などの微生物は生理活性を有する二次代謝物の生産者として着目されている (61, 62)。現在使用されている大多数の薬物の多くは微生物の二次代謝産物またはその誘導体から得られたものである (61)。生理活性を有する二次代謝産物の産生能力には、微生物種による偏りがある。微生物由来の生理活性二次代謝産物の最も主要な生産者は放線菌であり、既知生理活性化合物の 45%に相当する 10,000 種類以上の生理活性化合物を生産する最大の生産者グループとなっている (62)。また 2 番目に大きな生産者グループは糸状菌を含む真菌類であり既知生理活性化合物の 38%にあたる約 8600 種類の生理活性化合物を生産する。他の生産者としては主に *Bacillus* 属と *Pseudomonas* 属に属する細菌であり、全体の 17%に相当する約 3800 種の生理活性化合物を生産する。

海洋環境の微生物叢は生理活性を有する二次代謝産物源として、広大かつほとんど未開拓な領域である (63)。海洋環境に生息する微生物には広範な生物活性をもつ二次代謝産物を合

成する能力があることが明らかとなっており、海洋由来微生物は創薬リード化合物をスクリーニングするための重要かつ新しいライブラリーとして重要視されている (64-66)。

以上のことから、海洋環境由来の放線菌と糸状菌の培養液には様々な生理活性を有する二次代謝産物が含まれていると期待でき、それらをスクリーニング源として用いることで、組換え CHO 細胞の mAb 生産性向上に有効な細胞周期停止化合物を効率的に探索可能と考えた。また、医薬品開発で通常よくとられるアプローチとして、目的の活性を有するリード化合物の探索を出発点として、さらに構造修飾や類縁体評価をすることで有効性や安全性を向上させる手法がある。それと同様、本章で実施するスクリーニング試験によって新しい細胞周期停止化合物が得られれば、それをリード化合物として、その周辺化合物に研究範囲を広げることで CHO 細胞の生産性向上にさらに適した化合物が見いだせると期待できる。

本章の研究では、720 種の海洋由来微生物の培養液抽出物 (沖縄近海から収集された放線菌 400 株、糸状菌 320 株の抽出物) について、IgG1 抗体を生産する組換え CHO 細胞に与える影響を評価し、細胞周期停止による生産性向上が期待できる抽出物を探索した。その際、効果判定指標として次に挙げる 3 点を設定した。1) 比増殖速度 (μ) の低下、2) 比生産速度 (Q_p) の向上、および 3) 細胞生存率を低下させないこと。細胞周期解析は煩雑な手法であり、多検体評価の試験系としては不適である。そのため本章では、細胞周期解析に代えて細胞周期停止の結果として生じる μ の低下と Q_p 向上を指標とした。上記 3 点の効果がみられた抽出物の中には、その効果を発揮する有効成分 (以下、活性化合物と記す) が含まれていると推定できる。目的の効果がみられた抽出物を分画して活性化合物を含む画分 (以下、活性画分と記す) を特定した。抽出物の分画はオクタデシルシリル (octadecylsilyl, ODS) オープンカラムを用いた粗分画 (5 画分)、および高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) を用いた細分画 (49 画分) の 2 段階で実施し、粗分画で特定した活性画分に対して HPLC でさらに分画して活性画分を絞り込むというアプローチをとった。その後、質量分析法 (mass spectrometry, MS) を用いて活性画分の主成分を推定し、活性化合物候補とした。

また本章研究にて各抽出物による CHO 細胞の IgG 生産性への影響を評価するにあたり、 μ が約半分まで低下する条件で試験することを企図し、試験条件を設定した。mAb 生産性向上のための細胞周期停止のためには、CHO 細胞の増殖は完全には停止させるべきではなく、むしろ緩やかな増殖阻害効果が必要である。強すぎる増殖阻害効果は細胞死を誘導するため、生産性の低下をもたらす。IC₅₀ 値は抗がん剤研究において目的化合物の細胞毒性の強さの指標として用いられることが多く、薬剤処理後の生細胞数や細胞生存率に対する 50%阻害率として算出されることが多い (67, 68)。本研究では緩やかな増殖阻害活性を数値化するために比増殖速度 (μ) に対する 50%阻害濃度を用い、培養液への抽出物添加濃度を定める際の指標として用いた。

第2節 実験材料及び実験方法

(1) 細胞株及び培地

本研究では指標細胞として、遺伝子組換え CHO 細胞株である ATCC® CRL-12445™ (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) を用いた。CRL-12445 株は Gonzalez らによって構築された CHO-DP12 由来の組換え細胞株であり、インターロイキン 8 に対するヒト化 IgG1 抗体 (以下、単に IgG と記す) を産生する (69)。IgG 遺伝子の発現ベクターは、Lucas らによって開発されたジシストロニックベクターであり、シミアンウイルス 40 (SV40) およびサイトメガロウイルス最初期遺伝子 (CMV) のプロモーター及びエンハンサーが用いられている (70)。SV40 及び CMV のプロモーターはいずれも強力な構成的プロモーターであり、哺乳類細胞の組換えタンパク質発現に一般的に用いられている。CRL-12445 株の培地としては、市販無血清培地である BalanCD® Growth A 培地 (Fujifilm Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) に、200 nM メトトレキサート (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ カナマイシン硫酸塩 (Fujifilm Wako Pure Chemical, Osaka, Japan)、5 mM L-グルタミン (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、および 1mg mL^{-1} プルロニック™ F-68 (Thermo Fisher Scientific) を添加したものを使用した (以下、Growth A 培地と記す)。CRL-12445 株を ATCC (American Type Culture Collection) から購入後、Growth A 培地に浮遊馴化させた後、ワーキングセルバンクとして凍結細胞バイアルを 150 本程度作成した。ワーキングセルバンクは試験に供するまで -150°C ディープフリーザー内で凍結保管した。本研究では試験時の細胞状態を可能な限り統一するため、培養バッチごとに新たな凍結細胞バイアルを用い、3-4 回継代培養した後に細胞培養試験に用いた。本博士論文の研究で用いた CHO 細胞は全章を通して CRL-12445 株のみであるため、以下、CRL-12245 株を単に CHO 細胞と記す。

(2) 継代培養条件

30 mL の Growth A 培地を 125 mL 三角フラスコ (Corning, NY, USA) に加えた後、静置培養用 CO₂ インキュベーター HERACELL 150i (Thermo Fisher Scientific) で 37°C、5% CO₂ の環境下

で 30 分間インキュベートした (以下、この作業を平衡化と記す)。凍結細胞バイアルを 37℃ 浴槽で解凍し、生細胞密度 (viable cell density, VCD) が $2\text{--}3 \times 10^5 \text{ cell mL}^{-1}$ になるように平衡化済み Growth A 培地に CHO 細胞液を添加した。VCD が $1\text{--}2 \times 10^6 \text{ cell mL}^{-1}$ になるまで、振盪培養用 CO₂ インキュベーター BR-40LF (Taitec, Saitama, Japan) を用いて 37 °C、5% CO₂ (プラスチック内通気速度 15 mL min^{-1})、120 rpm で回転振盪培養した。その後、VCD が $2\text{--}3 \times 10^5 \text{ cell mL}^{-1}$ になるように新しい平衡化済み Growth A 培地 30 mL に CHO 細胞培養液を添加し、再び振盪培養用 CO₂ インキュベーターで培養した。この作業をさらに 1 回または 2 回繰り返した後、以降の細胞培養試験に用いた。

(3) 海洋由来微生物の培養液抽出物

海洋由来微生物の培養液抽出物として、オーピーバイオファクトリー株式会社 (Okinawa, Japan) が保有している生物資源ライブラリーを利用した。生物資源ライブラリーのうち、沖縄近海から単離された微生物 720 株 (放線菌 400 株および糸状菌 320 株) をランダムに選択した。オーピーバイオファクトリー社にて、上記 720 株の微生物の培養と各培養液の酢酸エチル抽出を実施し、培養抽出物をジメチルスルホキシド (DMSO: Fujifilm Wako Pure Chemical) に溶解したものを入手した。抽出物調製手順は下記手順に従った。1) オーピーバイオファクトリー社規定条件で放線菌及び糸状菌を培養、2) 菌体を含む培養液に酢酸エチルを等量添加及び混合して酢酸エチル層を回収、3) エバポレーターで乾燥させて粉末を回収、および 4) 抽出に供した培養液量と等量の DMSO で再溶解。

(4) 微生物培養液抽出物の CHO 細胞増殖阻害率算出

対数増殖期中の CHO 細胞を新たな Growth A 培地で希釈し、VCD $3.0 \times 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$ に調製した細胞液を 96 ウェルマイクロプレート Nunc™ MicroWell™ (Thermo Fisher Scientific) に $100 \mu\text{L well}^{-1}$ で播種した。CHO 細胞液に放線菌または糸状菌の抽出物を、それぞれ 0.0625% (v/v) または 0.125% (v/v) で添加した。また、抽出物と同量の DMSO を添加したウェルを同一プレ

ート内に設け、コントロールとした。96 ウェルマイクロプレートに播種した CHO 細胞を静置培養用 CO₂ インキュベーターを用いて 37℃、5% CO₂ で培養した。培養 5 日後に Cell Counting Kit 8 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を用いて取扱説明書記載の手順で VCD を測定した。この測定法は、水溶性テトラゾリウム塩 WST-8 の細胞内還元を測定原理としている。細胞が有する脱水素酵素の働きによって細胞内で連鎖的に酸化還元反応が生じ、最終的に WST-8 が還元されて水溶性オレンジ色色素であるホルマザンが生成する。生成したホルマザン量と生細胞数には正の相関性があることから、ホルマザンの吸光波長である 450 nm の吸光度を測定することによって生細胞数を計測することができる。比増殖速度 (μ) と増殖阻害率はそれぞれ下記式 2) および 3) を用いて算出した。

$$\mu = \frac{\left(\text{LN} \left(\frac{\text{VCD}_{t_2}}{\text{VCD}_{t_1}} \right) \right)}{(t_2 - t_1)} \quad \text{式 2)}$$

$$\text{増殖阻害率} = \left(1 - \left(\frac{\mu_{\text{sample}}}{\mu_{\text{control}}} \right) \right) \times 100 \quad \text{式 3)}$$

LN: 自然対数、 t_1 および t_2 : 培養時間、 VCD_{t_1} および VCD_{t_2} : 培養時間 t_1 および t_2 時点での VCD、 μ_{sample} および μ_{control} : 培養液抽出物および DMSO (コントロール条件) 添加時の μ 。

(5) μ に対する 50% 阻害濃度の算出

規定濃度 (放線菌由来抽出物; 0.0625%, 糸状菌由来抽出物; 0.125%) での増殖阻害率が 50% 以上であった抽出物に対して、以下の手順で 50% 阻害濃度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) を算出した。対数増殖期中の CHO 細胞を新たな Growth A 培地で希釈し、VCD 3.0×10^4 cell mL⁻¹ に調製した。その後、放線菌または糸状菌抽出物をそれぞれ 0.0625% (v/v) または 0.125% (v/v) になるように添加した。次に、別に準備した CHO 細胞液 (3.0×10^4 cell mL⁻¹) と 1:1 混合することによって、6 段階の 2 倍希釈系列を調製した。96 ウェルマイク

ロプレートに上記 2 倍希釈系列を 100 μL well⁻¹ で添加した。前記 (4) と同様の条件で細胞培養し、各抽出物濃度での増殖阻害率を算出した。抽出物濃度と増殖阻害率をプロットしたグラフを、4 パラメーターロジスティック曲線にフィッティングさせ、各抽出物の IC₅₀ 値を算出した。回帰フィッティングと IC₅₀ 値算出には解析ソフトウェア GraphPad Prism5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いた。

(6) 微生物培養抽出物による CHO 細胞の Qp と細胞生存率への影響評価

IC₅₀ 値が低い 44 の抽出物について、下記手順により CHO 細胞に対する Qp と細胞生存率への影響を評価した。対数増殖期中の CHO 細胞培養液を、新しい Growth A 培地で希釈して VCD 1.0×10^6 cell mL⁻¹ になるように調製した。その後、細胞液を 125 mL 三角フラスコ (Corning) に 30 mL ずつ分注した。放線菌または糸状菌抽出物を、それぞれの IC₅₀ 値の 5,000 倍濃度になるように DMSO を用いて調製した。次に各抽出物 DMSO 溶液を CHO 細胞液量に対して 0.1% (v/v) 添加した (抽出物最終濃度が IC₅₀ 値の 5 倍量となるように添加)。またコントロールとして、DMSO のみ 0.1% (v/v) 添加した CHO 細胞液を用意した。なお、DMSO は哺乳類細胞の細胞増殖に影響を与えることが知られているが、0.1% (v/v) では本研究で利用した CHO 細胞株においては増殖性に影響しないことを予備試験にて確認済みである (予備試験結果では 1.0%以下では影響なし。Fig. 1S)。各 CHO 細胞液は振盪培養用 CO₂ インキュベーター BR-40LF (Taitec) を用い、37 °C、5% CO₂ (フラスコ内通気速度 15 mL min⁻¹)、120 rpm で回転振盪培養した。培養 3 日後に VCD と細胞生存率、また IgG 濃度をそれぞれ Vi-CELL XR (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) 及び Octet QKe system (ForteBio, Fremont, CA, USA) を用い、取扱説明書記載の手法に従って測定した。Vi-CELL XR はトリパンブルー染色法を測定原理としており、生細胞及び死細胞を分けて自動計測可能な装置である。また Octet QKe system は、目的タンパク質に特異的結合可能な物質を固定化した光学センサーを用いることによってセンサーとの特異的結合量を経時的に検出し、目的タンパク質の濃度を測定する装置である。比生産速度 (Qp) は培養開始時と培養 3 日後の IgG 濃度差を、その期間の積算生細胞密

度 (Integrated viable cell density, IVCD) で除することにより算出した。IVCD は培養開始時と培養 3 日後の VCD から、下記式 4) より算出した。

$$IVCD = \frac{(t_2 - t_1)(VCD_{t_2} + VCD_{t_1})}{2} \quad \text{式 4)}$$

t_1 および t_2 : 培養時間、 VCD_{t_1} および VCD_{t_2} : 培養時間 t_1 および t_2 時点での VCD。

なお本試験での各抽出物添加量を IC_{50} 値と同一にせずその 5 倍量とした理由は、フラスコ振盪培養条件で増殖阻害効果をもたらすにはマイクロプレート培養条件よりも高い添加濃度が必要であったためである。予備試験では、マイクロプレートで算出された IC_{50} 値の 5 倍量を添加すると、目安とする増殖阻害活性、すなわち比増殖速度 (μ) の 50%阻害に近い効果がみられた。そのため、フラスコ試験で添加する濃度はマイクロプレートを用いて算出した IC_{50} 値の 5 倍が適していると判断した。マイクロプレートとフラスコを用いた試験間で添加濃度による影響が異なっていた原因については不明であるが、培養時の振盪有無または初期細胞密度の違いによる影響の可能性が考えられる。

(7) オープンカラムを用いた粗分画処理及び画分評価

Qp 向上効果を示し、かつ細胞生存率の減少を引き起こさなかった微生物培養液抽出物を、下記手順に従って ODS オープンカラムクロマトグラフィーにを用いて分画した。微生物培養液抽出物 12 mL を 3 g の ODS 樹脂 COSMOSIL 75C₁₈-OPN (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) に添加し、それぞれ 15 mL の 20%、40%、60%、80%アセトニトリル水溶液及び 100%アセトニトリルでステップワイズ溶出した。溶出画分を 40°Cロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、乾燥粉末を得た。その後、各乾燥粉末をそれぞれ 12 mL の DMSO で再溶解した。本研究では ODS 樹脂からの回収率を 100%と仮定した。各画分の DMSO 溶液を分画前抽出物の IC_{50} 値の 5 倍濃度でそれぞれ CHO 細胞培養液に添加して前記 (6) と同様の手法でフラスコ振盪培養し、 μ 、Qp および細胞生存率に対する影響を評価した。

(8) HPLC による細分画処理

CHO 細胞に対する μ 低下と Qp 向上効果を示した ODS オープンカラム画分について、下記手順により HPLC にてさらに細かく分画し、活性画分の特定を試みた。ODS オープンカラム画分を 40°C で真空濃縮して乾燥粉末を得た後、アセトニトリルで再溶解して 1 mg mL⁻¹ になるように調製した。その後、下記条件で HPLC 分画処理に供した。

装置	: Prominence 分取システム (Shimadzu, Kyoto, Japan)
分析カラム	: 各検体について、それぞれ下記のカラムを用いた。 A26_frc. 5 および A370_frc. 3; DAISOpak SP-120-5 ODS-BIO column ϕ 4.6 mm $\times$ 150 mm (OSAKA SODA, Osaka, Japan) A278_frc. 3 および F67_frc. 3; COSMOSIL 5C ₁₈ -AR-II ϕ 4.6 mm $\times$ 150 mm (Nacalai Tesque)
移動相 A	: アセトニトリル
移動相 B	: 超純水
タイムプログラム	: 各検体について、それぞれ下記のタイムプログラムを用いた。 A26_frc.5; A/B = 70/30 (0 min) $\rightarrow$ 100/0 (15 min) $\rightarrow$ 100/0 (25 min) A370_frc.3; A/B = 40/60 (0 min) $\rightarrow$ 100/0 (20 min) $\rightarrow$ 100/0 (25 min) A278_frc.3; A/B = 40/60 (0 min) $\rightarrow$ 60/40 (20 min) $\rightarrow$ 60/40 (25 min) F67_frc.3; A/B = 40/60 (0 min) $\rightarrow$ 70/30 (20 min) $\rightarrow$ 70/30 (25 min)
ダイオードアレイ検	: 200–700 nm
出波長	
流速	: 1 mL min ⁻¹
注入量	: 5 μ L
分画条件	: 0.5 min fraction ⁻¹ とし、最初の 0.5min を除いた 49 画分を回収

(9) 増殖阻害活性を示す HPLC 活性画分の特定

各 HPLC 画分を遠心エバポレーターで乾燥させて粉末化した後、5 μL の DMSO に再溶解した。前記 (4) と同様の方法で CHO 細胞を $\text{VCD } 3.0 \times 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$ で 96 ウェルマイクロプレートに播種し ($100 \mu\text{L well}^{-1}$)、各 HPLC 画分を含む DMSO 溶液を $1 \mu\text{L well}^{-1}$ 添加した。CO₂ インキュベーターで 5 日間静置培養した後、VCD を測定した。他の画分と比較して、CHO 細胞の VCD が著しく低くなった画分に増殖阻害成分が含まれていると判断した。

(10) マススペクトル解析

増殖阻害活性を示した HPLC 画分を超高速液体クロマトグラフィー・飛行時間型質量分析 (Ultra-High Performance Liquid Chromatography Time Of Flight-Mass Spectrometry, UHPLC-TOF-MS) に供し、画分に含まれる主成分を推定した。

1) A278 および F67 の HPLC 活性画分解析

前記 (9) で特定した HPLC 画分をそれぞれ 1 つのチューブにまとめて遠心エバポレーターで減圧濃縮して乾燥粉末を得た。その後、メタノールを用いて各粉末を $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ になるように調製し、下記条件で UHPLC-TOF-MS 解析に供した。

使用装置	: ACQUITY UPLC および G2-S QToF (Waters, Milford, MA, USA)
使用カラム	: ACQUITY UPLC BEH C18 $1.7 \mu\text{m } \phi 2.1 \times 50 \text{ mm}$ (Waters)
移動相 A	: 0.1%ギ酸 5%アセトニトリル水溶液
移動相 B	: 0.1%ギ酸 100%アセトニトリル
タイムプログラム	: A/B = 100/0 (0 min) $\rightarrow$ 0/100 (5 min) $\rightarrow$ 0/100 (6.5 min)
流速	: 0.8 mL min^{-1}
注入量	: $2 \mu\text{L}$

ダイオードアレイ検 : 200–500 nm

出波長

イオン化モード : エレクトロスプレーイオン化法、正イオンおよび負イオン

m/z 測定範囲 : 100–1500

LC クロマトグラムのメインピークについて MS スペクトルを取得し、得られた MS スペクトルに基づいて装置付属ソフトウェア (MassLynx V4.1) を用いて分子式を解析した。MassLynx では分子関連イオンの精密質量精度、安定同位体強度比、および安定同位体精密質量の 3 つの情報に基づいた組成演算アルゴリズムによって分子式を解析可能である。また、MassLynx による解析では推定された分子式毎に解析信頼度 (Confidence %) を算出可能であり、Confidence %が 100%に近いほど分子式の推定精度が高いと判断できる。解析により推定された分子式を有する化合物を天然物辞典 (71) 収録化合物と照らし合わせ、放線菌または糸状菌が生産しうる化合物を主成分として推定した。

2) A26 および A370 の HPLC 活性画分解析

前記 (9) で特定した HPLC 活性画分のうち、LC クロマトグラムのピークサイズが最も大きかったピークを含む画分を遠心エバポレーターで減圧濃縮して乾燥粉末を得た。必要に応じて前記 (9) と同様の手法で分画処理及び増殖阻害活性を繰り返し実施し、MS 解析に必要な粉末量を確保した。メタノールを用いて各粉末を 10 mg mL⁻¹になるように調製し、上記 1) 記載条件で UHPLC-TOF-MS 解析に供した。ただし、カラムのみ外して配管を直結し、最初に検出される極大ピークの MS スペクトルを取得した。得られた MS スペクトルに基づいて上記と同様の手法で分子式解析及び化合物の推定を行なった。

第3節 結果

(1) 微生物培養抽出物の CHO 細胞に対する増殖阻害及び Qp 向上効果

計 720 種類の微生物培養液抽出物 (放線菌由来 400 種、糸状菌由来 320 種) を評価し、増殖阻害率が 50%以上あるものをスクリーニングした結果、85 抽出物 (放線菌由来 61 種、糸状菌由来 24 種) が該当した (Fig. 2)。この 85 抽出物について、CHO 細胞の μ に対する IC_{50} 値を算出した。CHO 細胞に対して高い増殖阻害効果を有する抽出物として IC_{50} 値が低い順番に 44 抽出物 (放線菌 29 種、糸状菌 15 種) を選択した。この 44 抽出物の IC_{50} 値を Table 1 に示す。これらの 44 抽出物のうち、9 抽出物 (A278、A245、A204、A265、A370、A369、A26、A148 および F67) は CHO 細胞の細胞生存率低下を引き起こさずに Qp を向上した (Fig. 3)。これら 9 抽出物は 3 日培養後細胞生存率がいずれも 90%以上であり、Qp はコントロールより 30%以上向上した。他の 35 抽出物は、3 日培養後細胞生存率が 90%未満まで低下したか、または Qp 向上効果が 30%未満であった。

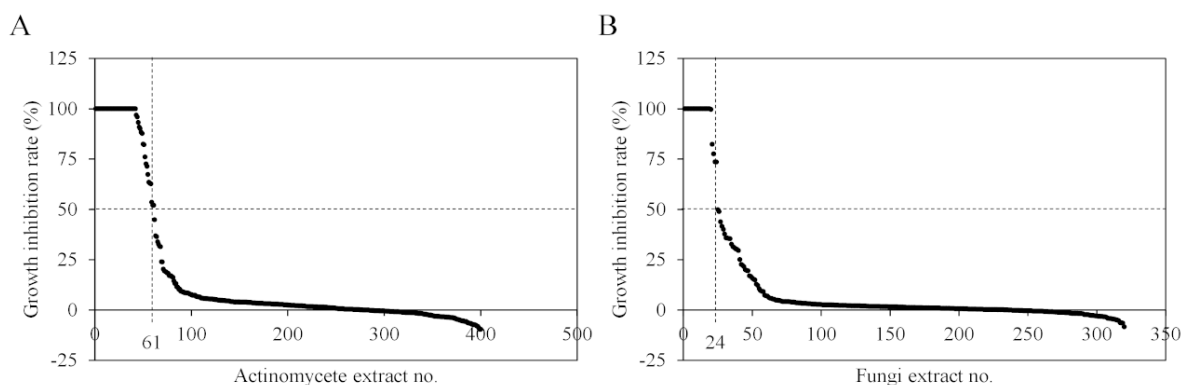


Fig. 2. Growth inhibition rates of actinomycetes and fungal extracts in CHO cells.

CHO cells were cultured with various microbial extracts using 96 well microplates for 5 days. (A) Actinomycete extracts. (B) Fungal extracts. The data were obtained from a single experiment.

Table 1. IC₅₀ values for specific growth rates (μ) in CHO cells.

Actinomycete extract				Fungal extract	
Sample ID	IC ₅₀ % (v/v)	Sample ID	IC ₅₀ % (v/v)	Sample ID	IC ₅₀ % (v/v)
A_39	0.0019	A_289	0.0170	F_131	0.0002
A_300	0.0019	A_365	0.0181	F_117	0.0039
A_182	0.0021	A_202	0.0198	F_280	0.0074
A_183	0.0022	A_65	0.0200	F_116	0.0084
A_335	0.0024	A_68	0.0205	F_25	0.0156
A_304	0.0033	A_201	0.0206	F_139	0.0179
A_216	0.0036	A_265	0.0211	F_99	0.0204
A_219	0.0036	A_178	0.0214	F_185	0.0216
A_278	0.0086	A_370	0.0220	F_316	0.0218
A_23	0.0100	A_369	0.0239	F_64	0.0229
A_245	0.0101	A_26	0.0249	F_67	0.0248
A_204	0.0109	A_136	0.0269	F_88	0.0304
A_217	0.0122	A_148	0.0273	F_286	0.0336
A_109	0.0125	A_60	0.0314	F_197	0.0347
A_203	0.0137	-	-	F_73	0.0530

IC₅₀ is the concentration that inhibits 50% of the target index. A lower IC₅₀ indicates a stronger decreasing effect on μ . The data were obtained from a single experiment.

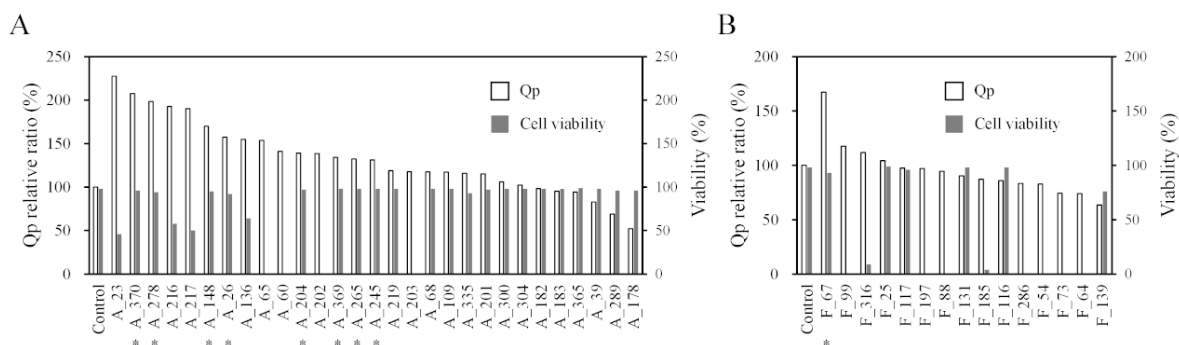


Fig. 3. Relative ratio of specific production rate (Qp) and cell viability.

CHO cells were cultured with various microbial extracts using Erlenmeyer flasks for 3 days. (A) Actinomycete extracts. (B) Fungal extracts. The Qp of the control flask is shown as 100%. * Selected microbial extracts that improved the Qp by 30% or more compared with controls and maintained viability at 90% or more after 3 days incubation. The data were obtained from a single experiment.

(2) 活性画分の特定

Qp 向上効果を示した 9 抽出物を ODS オープンカラムで分画し、各画分の CHO 細胞の μ 、Qp および細胞生存率に対する影響を評価した。評価した計 45 画分 (9 抽出物 $\times$ 5 画分) のうち、4 画分 (A26_Frc.5、A278_Frc.3、A370_Frc.3、および F67_Frc.3) に μ 低下及び Qp 向上効果がみられた (Fig. 4)。A26_Frc.5、A278_Frc.3、A370_Frc.3、および F67_Frc.3 を CHO 細胞に添加することによって、コントロール条件と比較して μ はそれぞれ 52%、59%、50% および 36% 低下した。一方、これらの画分添加によって、コントロール比で Qp はそれぞれ 109%、108%、109% および 84% 増加した。この結果から、CHO 細胞の細胞周期停止をもたらす成分が、この 4 画分に存在していると推測された。また、培養 3 日後の細胞生存率は全ての画分添加条件で 95% 以上を維持しており、分画前の抽出物と同様に細胞毒性は観察されなかった。

一方、5 抽出物 (A148、A204、A245、A265 および A369) ではいずれの画分においても添加による影響は確認できなかった。これらの抽出物の活性成分は ODS 樹脂との結合力が強

く、従って分画工程で溶出されなかった可能性がある。または、これらの抽出物には複数の活性成分が含まれており、分画処理によって成分の相加または相乗的な効果が失われた可能性もある。これらの 5 抽出物について、分画条件を変更することによって目的の活性を示す画分が得られる可能性はあるが、スクリーニングの効率性を優先し、本研究ではさらなる検討は実施しなかった。

活性画分として特定できた 4 つの ODS オープンカラム画分を、HPLC でさらに細かく分画して各画分の増殖阻害効果を評価した。Figure 5 に示すように、A26_Frc.5 は保持時間 10.5–16.0 min (fraction no. 21–31) の広い範囲にわたって増殖阻害活性を示した。一方、A370_frc.3、A278_frc.3 および F67_frc.3 はそれぞれ保持時間 4–5 min (fraction no. 8–9)、11–12 min (fraction no. 22–23) および 8–9 min (fraction no. 16–17) の狭い範囲のみ増殖阻害活性を示した。A278_frc.3 と F67_frc.3 で増殖阻害活性を示したピークは HPLC のメインピークと同一であった。一方、A26_frc.5 と A370_frc.3 はメインピークとは異なるサブピークに増殖阻害活性がみられた。

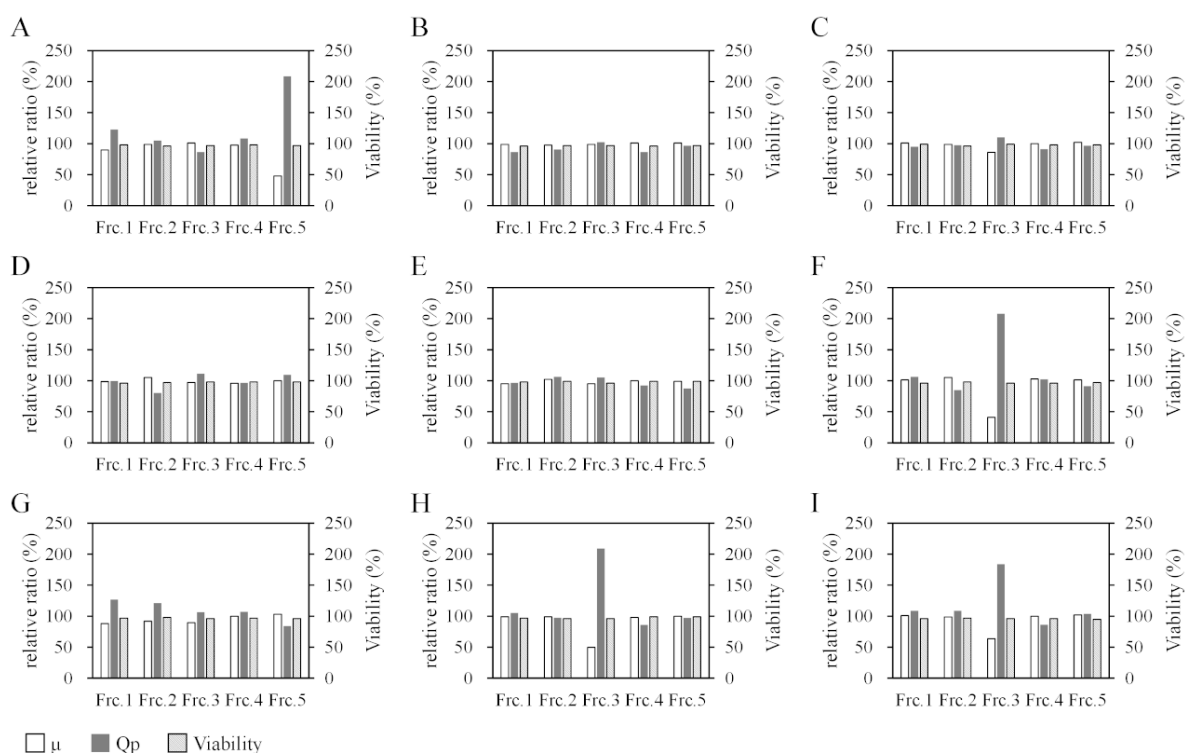


Fig. 4. Effects of open ODS column fractions on specific growth rate (μ), specific production rate (Q_p) and cell viability.

CHO cells were cultured with fractions of microbial extracts using Erlenmeyer flasks for 3 days. The relative ratios of μ and Q_p compared with controls, and cell viability on day 3 are shown. (A) A26, (B) A148, (C) A204, (D) A245, (E) A265, (F) A278, (G) A369, (H) A370, and (I) F67. The data were obtained from a single experiment. Frc., fraction.

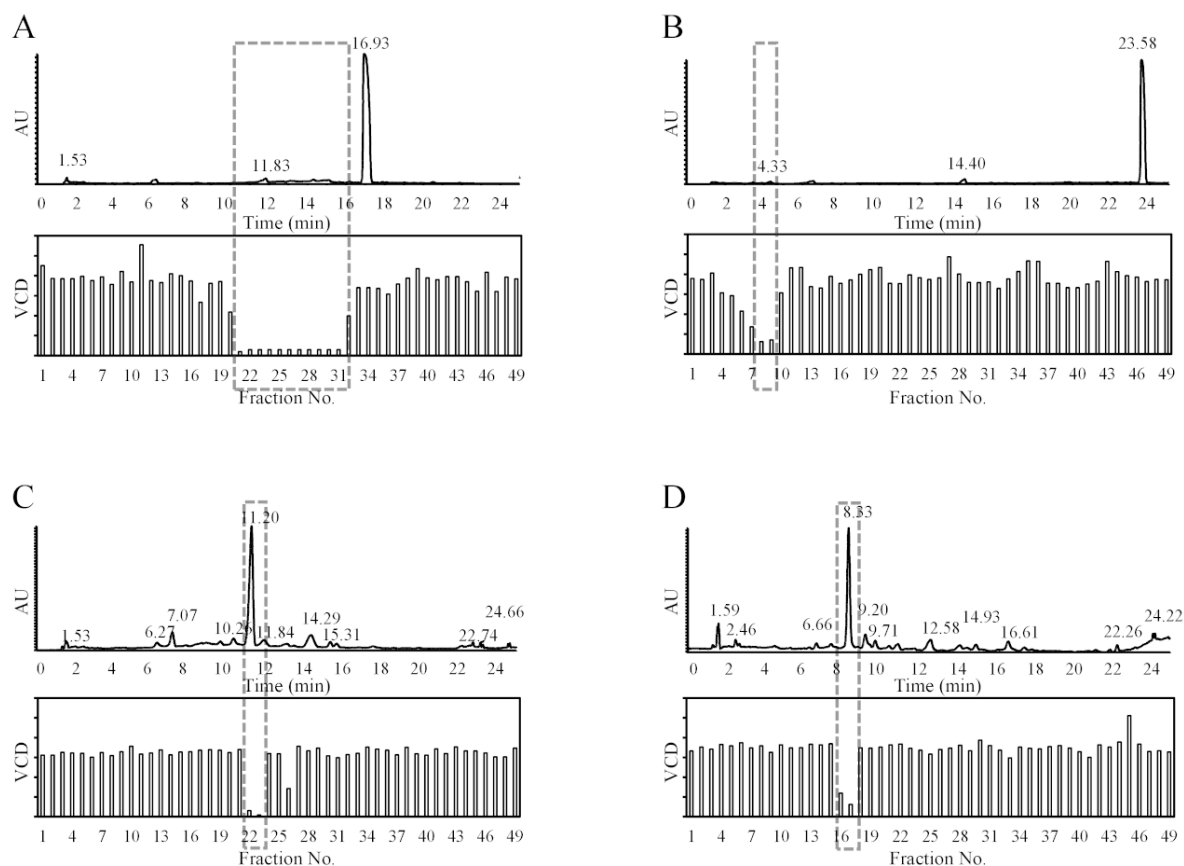


Fig. 5. Identification of active fractions.

The high-performance liquid chromatography chromatogram is shown in the upper panel, and the viable cell density after 5 days incubation is shown in the lower panel. Gray dotted lines show active fractions. (A) A26_frc. 5, (B) A370_frc. 3, (C) A278_frc. 3 and (D) F67_frc. 3. The data were obtained from a single experiment. VCD, viable cell density; AU, absorbance unit; No., number.

(3) 活性画分の主成分解析

A26_frc. 5、A370_frc. 3、A278_frc. 3、および F67_frc. 3 の活性画分を本章第 2 節 (10) に記載した手法にて UHPLC-TOF-MS に供した。A278_frc. 3 と F67_frc. 3 においては、それぞれ LC クロマトグラム (Fig. 6) の保持時間 2.94 min と 2.70 min の位置に確認されたメインピークを主成分と判断し、MS スペクトルを取得した。A26_frc. 5 と A370_frc. 3 においては、HPLC

分画時の LC クロマトグラム (Fig. 5) に基づき、それぞれ保持時間 11.83 min および 4.33 min のピークを活性画分の主成分と判断し、そのピークを含む画分の MS スペクトルを取得した。得られた MS スペクトル (Fig. 7) に基づいて、各成分の分子式を解析した (Table 2)。A26_frc.5 の HPLC 活性画分の MS スペクトルからは、 $[M+H]^+ = m/z$ 394.2868 と $[M-H]^- = m/z$ 392.2699 のシグナルが得られ、A26 の活性画分主成分のノミナル質量は 393 であると推定した。また、正および負イオンモードの MS スペクトルから化学式は $C_{25}H_{35}N_3O$ であると推定された。

A370_frc.3 の HPLC 活性画分の MS スペクトルからは、 $[M+H]^+ = m/z$ 467.2080、 $[M+Na]^+ = m/z$ 489.1886、 $[2M+H]^+ = m/z$ 933.4066 および $[2M+Na]^+ = m/z$ 955.3898 のシグナルが得られた。負イオンモードのマススペクトルからは明確なシグナルが得られなかった。正イオンモードの MS スペクトルから A370 の活性画分主成分のノミナル質量と分子式を推定した結果、466 および $C_{28}H_{26}N_4O_3$ と推定された。

A278_frc.3 の HPLC 活性画分の MS スペクトルからは、 $[M+H]^+ = m/z$ 1101.4282、 $[M+Na]^+ = m/z$ 1123.4009、 $[1/2M + H]^+ = m/z$ 551.2194、および $[M-H]^- = m/z$ 1099.4161 のシグナルが得られた。これらのシグナルから、A278 の活性画分主成分のノミナル質量を 1100 と推定した。しかし、正イオンと負イオンモードでそれぞれ推定した分子式には共通性がなく、また分子式信頼度はいずれも低かったため、分子式を推定できなかった。この原因はおそらく MS に供した HPLC 活性画分の成分純度が十分高くなかったためと推測される。

F67_frc.3 の HPLC 活性画分の MS スペクトルからは、 $[M+Na]^+ = m/z$ 548.2274、 $[2M+H]^+ = m/z$ 1051.4806、 $[2M+Na]^+ = m/z$ 1073.4630、 $[M-H]^- = m/z$ 524.2286、 $[M+HCOO]^- = m/z$ 570.2341 および $[2M-H]^- = m/z$ 1049.4658 のシグナルが得られ、F67 の活性画分主成分のノミナル質量は 525 と推定された。また、MS スペクトルからその分子式は $C_{29}H_{35}NO_8$ であると推定した。

天然物辞典 (71) 収載の化合物から、推定分子式を有する化合物を探索し、放線菌または糸状菌が産生する化合物を各活性画分の主成分であると推定した。A278 活性画分の主成分については前述したように分子式は推定できなかったため、分子量と起源のみから化合物を推測した。その結果、各活性画分の主成分としてそれぞれ次の化合物が推定された。A26; ウンデ

シルプロジギオシン, A370; スタウロスポリン, A278; antibiotic S 728 またはムライマイシン C1 3''-O- (8-メチルノナノイル), F67; サイトカラシン E 4'-メトキシまたはサイトカラシン K 4'-メトキシ。各化合物の構造式を Figure 8 に示す。

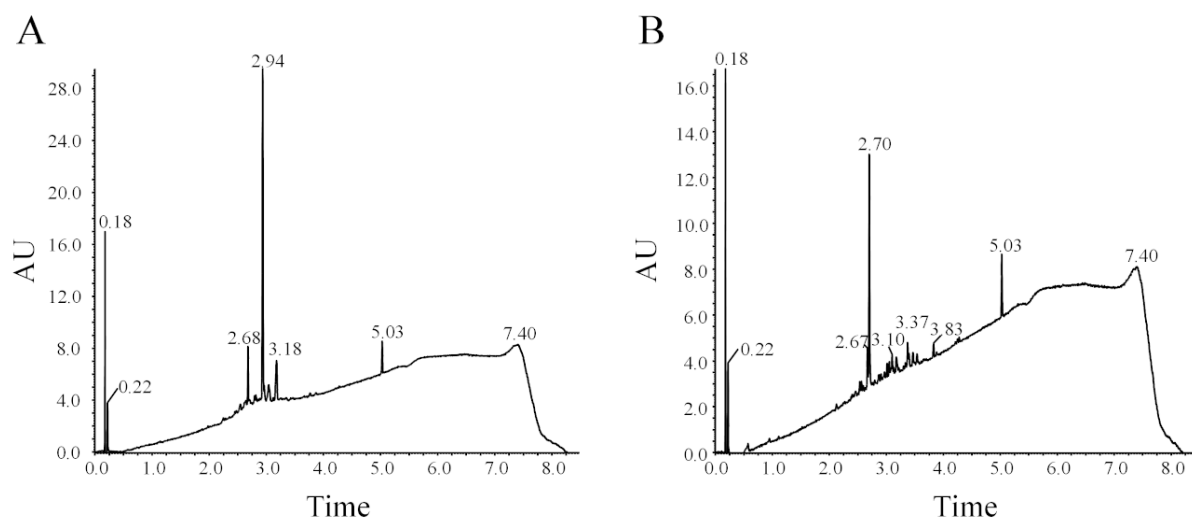


Fig. 6. UHPLC-TOF-MS chromatograms.

Active fractions of (A) A278_frc. 3 and (B) F67_frc. 3 were analyzed using UHPLC-TOF-MS. The peak with a retention time of 2.94 or 2.70 minutes was estimated to be the main component of each sample, and the MS spectrum was acquired, respectively.

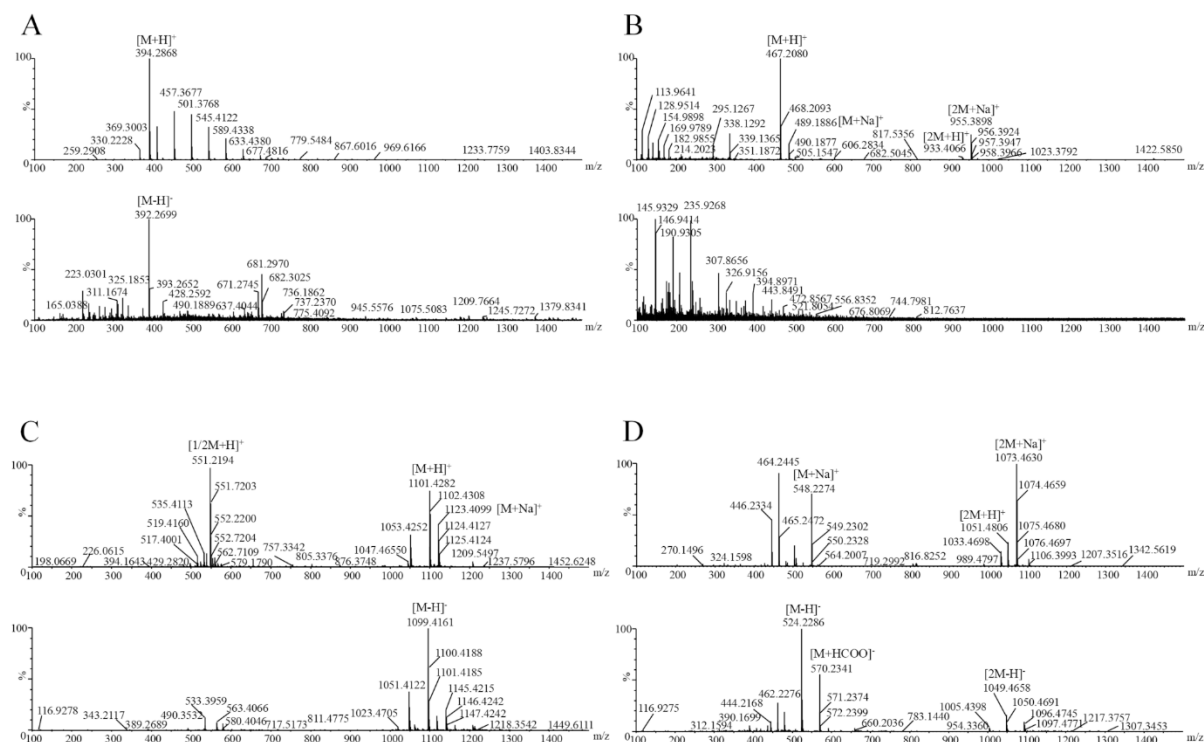


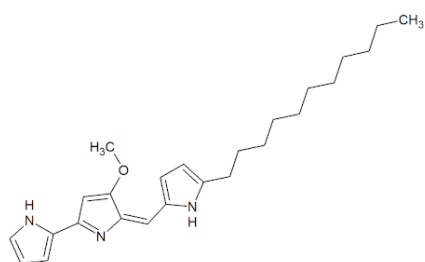
Fig. 7. Mass spectrum of active fractions.

Each high-performance liquid chromatography fraction showing growth-inhibitory activity was analyzed by ultra-high performance liquid chromatography time of flight mass spectrometry. The mass spectrum of main peak of liquid chromatography chromatogram was acquired. The spectrum in positive ion mode is shown in the upper panel and that in negative ion mode is shown in the lower panel. Active fractions of (A) A26, (B) A370, (C) A278, and (D) F67.

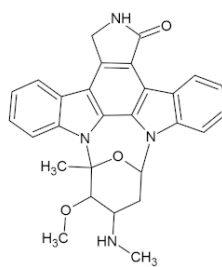
Table 2. Molecular formula analysis based on mass spectrum.

Sample	ion mode	Obs. Mass	Calc. Mass	Confidence (%)	Formula
A26	positive	394.2868	394.2858	99.97	C ₂₅ H ₃₆ N ₃ O
	negative	392.2699	392.2702	100.00	C ₂₅ H ₃₄ N ₃ O
A370	positive	467.2080	467.2083	98.31	C ₂₈ H ₂₇ N ₄ O ₃
A278	positive	1101.4282	1101.4273	54.48	C ₆₅ H ₆₅ O ₁₆
	negative	1099.4161	1099.4161	7.02	C ₅₃ H ₄₇ N ₂₄ O ₅
F67	positive	548.2274	548.2260	85.44	C ₂₉ H ₃₅ NO ₈ Na
	negative	524.2286	524.2284	37.04	C ₂₉ H ₃₄ NO ₈

Molecular formulae were deduced from the obtained mass spectra using G2-S QTOF software, MassLynx V4.1 (Waters). Among the candidate formulae, those that have the largest confidence rate for each sample and ion mode are listed. Obs., observed; Calc., calculated.

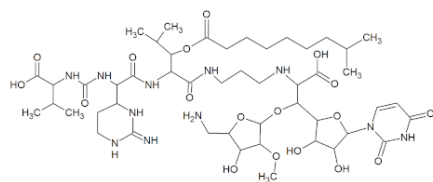


Undecylprodigiosin

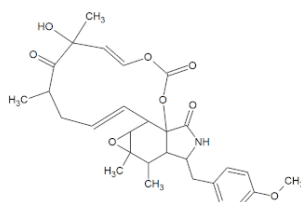


Staurosporine

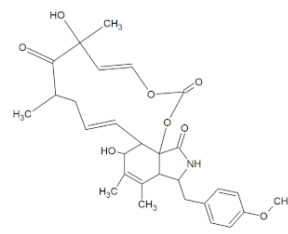
Structure unknown



Muraymycin C1 3''-O-(8-methylnonanoyl)



Cytochalasin E 4'-methoxy



Cytochalasin K 4'-methoxy

Fig. 8. The deduced compounds as main components of the active fractions.

Structural formulae were drawn using ACD/ChemSketch (Freeware) version 2018.2.5.

第4節 考察

本研究にて4つの活性画分の主成分として推定された化合物(スタウロスポリン、ウンデシルプロジギオシン、サイトカラシンEまたはK、antibiotic S728またはムライマイシン)については、次に示すような生理活性の報告がある。

スタウロスポリンは *Streptomyces* 属から単離された抗真菌活性を有する微生物アルカロイドであり(72)、CHO細胞を含む様々な哺乳類細胞の細胞周期をG1またはG2期で停止させる(73–75)。スタウロスポリンによる細胞周期停止のメカニズムは未だ完全には解明されていないが、CDK4、CDK2およびCDC2の活性阻害(76–79)、CDK4、CDK2、CDC2、サイクリンAおよびサイクリンBの発現量低下およびCKIであるp21およびp27の発現量増加(80–82)が関与していると考えられている。

ウンデシルプロジギオシンはプロジギニン類の一員である。プロジギニンは *Streptomyces* 属、*Hahella* 属、および *Pseudoalteromonas* 属などの様々な海洋細菌によって産生される赤色の色素であり、免疫抑制や抗腫瘍活性などの生理活性を有する(83–86)。ウンデシルプロジギオシンはT細胞やP388細胞の細胞周期をG1またはG2期で停止させることが報告されている(87, 88)。ウンデシルプロジギオシンはpRBのリン酸化を阻害し、またサイクリンE、サイクリンA、CDK2およびCDK4の発現を抑制することが知られており(87)、細胞周期進行に関与するこれらの因子への作用によって細胞周期の停止が誘導されと考えられている。

サイトカラシン類は構造的に多様な糸状菌の二次代謝産物であり、様々な生理活性がある(89)。サイトカラシン類において、最も良く知られている生理活性はアクチン重合阻害であり、細胞の接着性、運動性、シグナル伝達および細胞分裂に影響する(89)。またそれらに加え、サイトカラシンEには強力な抗血管新生効果があることも知られている(90)。サイトカラシンKはサイトカラシンEのピロリノン環のエポキシド結合の加水分解を経て生合成される(89)。サイトカラシンKはサイトカラシンEと構造的に類似であるが、その生理活性に関する報告例はほとんどない。今までのところ、サイトカラシンEおよびKの哺乳類細胞における細胞周期への影響についての知見はないが、他のサイトカラシン類であるサイトカラシン

B および D はそれぞれ Swiss 3T3 細胞とマウス線維芽細胞を G1 期で停止させることが報告されている (91, 92)。また分泌型アルカリホスファターゼ (secreted alkaline phosphatase, SEAP) を産生する組換え CHO 細胞を用いた Hayduk らの研究では、 $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ のサイトカラシン D 処理により SEAP 生産性が 2–3 倍に増加したことが報告されており (93)、サイトカラシン D が異種タンパク質の生産性向上に有効な細胞周期停止化合物であることを示唆している。前述したように、サイトカラシン E および K が細胞周期に影響する直接的な知見はないが、サイトカラシン B や D と同様、CHO 細胞の細胞周期停止に作用する可能性がある。

antibiotic S728 については生理活性の報告例はなく、CHO 細胞の細胞周期停止をもたらす可能性については既存知見からは判断できない。天然物辞典 (71) には S728 は *Streptomyces* 属から単離された構造不明のポリエン系抗生物質とのみ、記載されている。ムライマイシンは 2002 年に *Streptomyces* 属の培養液から単離されたウリジン由来の核酸ペプチドであり、グラム陽性細菌に対して抗菌活性を示すことが報告されている (94–96)。しかしながら、ムライマイシンによる哺乳類の細胞周期に対する効果については未だ報告例がなく、CHO 細胞の細胞周期停止に作用する可能性は不明である。

本章では、CHO 細胞の増殖性及び IgG 生産性に影響した 4 つの活性画分の主成分をそれぞれ推定した。主成分を正しく同定するためには核磁気共鳴法などの光学分析データ取得により化学構造を決定する必要があるが、本章における化合物推定は MS スペクトル及び化合物の由来情報のみに基づいたものであるため、その推定精度は限定的である。また、活性画分の主成分以外の成分が有効成分である可能性も考えられ、本章の結果のみでは推定した化合物が目的とする活性を有するものであるかどうかは不明である。そのため、本研究では推定主成分を活性化合物の候補とし、次に候補成分による CHO 細胞に対する作用の検証を試みた。本章で得た推定主成分はいずれも哺乳類細胞の組換えタンパク質生産性に与える作用に関する知見はない。これらの化合物の効果の実証により、これらを mAb 生産性向上のために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) として提案可能と期待できる。

第5節 小括

化学薬剤法の有効成分として使用可能な新たな細胞周期停止化合物の候補を探索するため、海洋由来微生物の培養抽出物を探索源としたスクリーニング試験を実施した。沖縄県近海から採取された微生物 720 株 (放線菌由来 400 株および糸状菌由来 320 株) の抽出物について、96 ウェルマイクロプレートを用いた培養試験によって CHO 細胞の増殖阻害活性を評価した。増殖阻害活性の強さを比増殖速度 (μ) に対する IC₅₀ 値を用いて評価し、低い IC₅₀ 値を有する抽出物を高増殖阻害抽出物として選別した。フラスコ培養試験により、これら高増殖阻害抽出物による、組換え CHO 細胞に対する Qp 向上効果と細胞生存率への影響を評価し、細胞毒性を示さずに IgG 生産性を向上する抽出物を選択した。その結果、評価に供した抽出物のうち 9 種類 (放線菌由来 8 種、糸状菌由来 1 種) の抽出物に目的とする効果が確認できた。ODS オープンカラム分画処理により得た計 45 画分 (9 種類×5 画分) について、細胞増殖性、IgG 生産性、および細胞生存率への影響を評価した結果、4 画分に期待する効果が確認できた。その 4 画分について HPLC を用いた細分画処理を実施し、細胞増殖阻害活性を有する画分を特定した。特定された画分には、細胞増殖阻害、すなわち細胞周期の進行に作用する成分が含まれていると考えられた。HPLC の活性画分を UHPLC-TOF-MS に供し、各画分の主成分を推定した。その結果、4 つの活性画分の主成分はウンデシルプロジギオシン、スタウロスポリン、antibiotic S 728 またはムライマイシン C13"-O-(8-メチルノナノイル)、サイトカラシン E 4'-メトキシまたはサイトカラシン K 4'-メトキシであると推定した。これらの化合物は、いずれも CHO 細胞の異種タンパク質生産性に関する作用についての報告例はない。これらの化合物の CHO 細胞への作用を検証し、IgG 生産性向上効果を実証できれば、化学薬剤法に用いる新たな細胞周期停止化合物として提案可能と期待できる。

次章では活性化合物候補の一つであるスタウロスポリンについて、CHO 細胞株に対する増殖性、IgG 生産性、及び細胞周期への影響を評価し、mAb 生産性向上剤としての有効性を検証した。

第2章 スタウロスポリンの mAb 生産性向上効果の検証

第1節 緒言

本章では、第1章で得られた活性化合物候補の一つであるスタウロスポリンについて、組換え CHO 細胞株に対する増殖性、IgG 生産性、および細胞周期への影響を評価し、mAb 生産性向上剤としての利用可能性を検証した。またバイオ医薬の実際の製造工程においては、生産物品質の一貫性も要求されるため、IgG 抗体の N 結合型糖鎖分布に及ぼす影響を調査し、生産物品質に与える影響についても評価した。

本章研究の実施にあたり、第1章にて活性化合物候補として得られた成分のうち試薬購入可能であった3種の化合物、ウンデシルプロジギオシン ($\geq 95\%$, 製品コード BVT-0422) (Adipogen Life Sciences, San Diego, USA)、サイトカラシン E ($\geq 98\%$, 製品コード BML-CT120) (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA)、およびスタウロスポリン ($\geq 95\%$, 製品コード 197-10251) (Fujifilm Wako Pure Chemical) について、事前に本章第2節 (3) と同様の手法で効果評価のための予備試験を実施した。その結果、スタウロスポリン処理にて目的とする効果 (CHO 細胞の μ 低下、Qp 向上及び細胞生存率を低下させないこと) が観察された。一方、ウンデシルプロジギオシンとサイトカラシン E 処理では、試験した濃度域 (それぞれ 10–100 nM、20–1000 nM) において目的とする効果はみられなかった (Table 1S)。ウンデシルプロジギオシンとサイトカラシン E 処理で目的とする活性がみられなかった理由について詳細は不明であるが、前章で用いた微生物抽出液画分の活性化合物と推定主成分が異なっていた可能性、画分に含まれる他の成分との相乗効果が大きく寄与していた可能性、または試験時の細胞状態の違いが影響した可能性などが考えられる。なお上記3種以外の活性化合物候補については試薬購入できなかったため未評価である。これらの成分については精製品を自ら作成し、同様の評価をすることで効果の確認ができると考えられる。しかしながら、細胞培養試験に使用可能な量の化合物を高純度に精製するためには、大容量培養装置と精製装置が必要であり、

作業的にも非常に煩雑であるため本研究ではこれ以上取り扱わず、今後の研究課題とした。

前述したように第 1 章での推定は MS スペクトル及び化合物由来情報のみに基づいたものであり A370 活性画分の主成分がスタウロスポリンとは異なる可能性があった。そのため、予備試験として標品との比較試験を実施し、同一成分であることを確認した。Fig. 2S (補足資料) に A370 活性画分とスタウロスポリン (Fujifilm Wako Pure Chemical) の LC-MS 解析データを示す。保持時間、UV スペクトルおよび MS スペクトルはほぼ同等であり、同成分と判断できる。なお保持時間には 0.06 分の差があるが、2 サンプル混合分析にてピーク割れや歪みは見られなかったため、成分濃度差や夾雑物による影響と考えられる。また MS シグナルの強度差は、濃度の違いや夾雑物の影響によりフラグメントイオンの生じ方に差が生じたためと考えられる。

スタウロスポリンは、1977 年に大村らによって *Streptomyces* 属から単離されたビスインドール骨格を有する微生物アルカロイドであり (72, 97)、様々な生理活性を示すことが知られている。その活性の一つは、プロテインキナーゼ阻害活性である。スタウロスポリンのキナーゼ選択性は低く、プロテインキナーゼ C を含む広範な範囲のキナーゼ活性を阻害する (98, 99)。第 1 章第 4 節でも言及したようにスタウロスポリンが阻害するキナーゼには、CDK4、CDK2 および CDC2 といった CDK も含まれる (76, 78, 79)。またキナーゼ活性阻害に加えて、スタウロスポリン処理による CDK4、CDK2、CDC2、サイクリン A およびサイクリン B の発現量の低下や、p21 と p27 発現量の増加が報告されており、これらの作用によって哺乳類細胞の細胞周期が停止する (80–82)。細胞周期に関するスタウロスポリンの研究は、グリオーマ細胞などの CHO 細胞以外の哺乳類細胞についてなされたものがほとんどである。しかしながら、Mateos らの研究において CHO K1 変異株を G1 期で停止させるための手法としてスタウロスポリンを用いたことが報告されており (73)、CHO 細胞に対してもグリオーマ細胞など同様に細胞周期停止作用を示すものと考えられる。

また、スタウロスポリンは様々な細胞に対する強力なアポトーシス誘導剤であることが知られている (100–104)。そのため、NaBu と同様に、スタウロスポリン処理による細胞周期停

止は細胞寿命の低下を引き起こし、タンパク質の総生産量向上には寄与しないことが懸念される。しかしその一方で、スタウロスポリン処理濃度の最適化によって、細胞死誘導を生じずに増殖のみを阻害できる可能性もある。Harmalkar らは、10–50 nM のスタウロスポリン処理はヒトグリオーマ細胞に対して明確な細胞死を引き起こさずに細胞増殖を阻害したことを報告している (80)。Harmalkar らの研究結果は、スタウロスポリンには細胞死を誘導せずに細胞周期のみに影響する濃度範囲が存在する可能性を示唆する。

細胞周期に関するスタウロスポリンの作用は、哺乳類細胞の組換えタンパク質生産性向上剤として使用できる可能性を示唆するものではあるが、その検証は未だされていない。本章の研究は、スタウロスポリンを組換えタンパク質生産性向上剤として検証する初めての試みとなる。

第2節 実験材料及び実験方法

(1) 細胞株及び使用培地

第1章と同様、ヒト化 IgG1 抗体を生産する遺伝子組換え CHO 細胞株 ATCC® CRL-12445™ (ATCC) を用いた。バッチ培養用培地およびフェドバッチ培養用基礎培地として、第1章第2節記載の Growth A 培地を用いた。また、フェドバッチ培養用のフィード培地として、BalanCD® Feed 1 (Fujifilm Irvine Scientific) に、200 nM メトトレキサート (Sigma-Aldrich) および 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ カナマイシン硫酸塩 (Fujifilm Wako Pure Chemical) を添加したものをを用いた (以下、Feed 培地と記す)。第1章と同様、試験時の細胞状態を可能な限り統一するため、培養バッチごとに新たな凍結細胞バイアルを用いて3–4回継代培養を行なった後に細胞培養試験に用いた。

(2) 継代培養条件

第1章第2節記載の手順に従って継代した。ただし、振盪培養用 CO₂ インキュベーターはタイテック社装置に替えて、キューナー社装置 (Adolf Kuhner AG, Birsfelden, Switzerland) を使用し、37°C、5% CO₂、80%湿度、120 rpm 回転振盪条件とした。なお、振盪培養用 CO₂ インキュベーターを変更した理由としては実験設備環境上の理由によるものであり、装置変更により CHO 細胞増殖性に影響がないことを予備試験にて確認している。

(3) バッチ培養

対数増殖期中の CHO 細胞培養液と新しい Growth A 培地を混合して、VCD $1.0 \times 10^6 \text{ cell mL}^{-1}$ になるように調製した。その後、細胞液を 30 mL ずつ 125 mL 三角フラスコ (Corning) に分注した。スタウロスポリン (Fujifilm Wako Pure Chemical) を 100% DMSO (Fujifilm Wako Pure Chemical) に溶解し、スタウロスポリン終濃度 1–300 nM および DMSO 終濃度 0.1% (v/v) になるように CHO 細胞液に添加した。コントロール条件 (0 nM スタウロスポリン) としては、細胞液に DMSO のみを終濃度 0.1% (v/v) になるように添加した。各フラスコを振盪培養用 CO₂ インキュベーター (Adolf Kuhner AG) を用いて、37 °C、5% CO₂、80%湿度および 120 rpm

の条件で 6 日間、回転振盪培養した。VCD と細胞生存率は改良ノイバウエル血球計算盤 (NanoEnTek, Seoul, Korea) とトリパンブルー染色法により計測した。各条件につきフラスコを 3 本ずつ用い、並行して培養した (n = 3)。

(4) フェドバッチ培養

本節 (3) 記載の手法で CHO 細胞液を調製し、スタウロスポリン濃度が 0 nM (コントロール) または 2–4 nM になるように、培養開始時に CHO 細胞液に添加した。また、培養 4 日目から培養終了時まで 1 日おきに細胞培養液の 5%量の Feed 培地を添加しながら 16 日間振盪培養した。Feed 培地添加条件以外の培養条件は本節 (3) と同様とした。各条件につきフラスコを 3 本ずつ用い、並行して培養した (n = 3)。

(5) VCD、細胞生存率、および IgG 濃度測定

フェドバッチ培養液の VCD 及び細胞生存率は Vi-CELL XR (Beckman Coulter) を用いて測定し、IgG 濃度は Octet QKe system (Fortebio) を用いて取扱説明書記載の手法に従って測定した。比生産速度 (Qp) は、縦軸を IgG 濃度、横軸を積算生細胞密度 (IVCD) としたグラフにプロットしたデータから算出した。具体的には、プロットしたデータのうち、直線性が維持されている範囲の近似直線の傾きを Qp とした。IVCD は培養期間中の VCD を用いて下記式 5) から算出した。また比増殖速度 (μ) は培養 0 日目及び 2 日目の VCD を用いて、第 1 章第 2 節に記載の式 2) から算出した。

$$IVCD = \sum \frac{(t_2 - t_1)(VCD_{t_2} + VCD_{t_1})}{2} \quad \text{式 5)}$$

t_1 および t_2 : 培養時間、 VCD_{t_1} および VCD_{t_2} : 培養時間 t_1 および t_2 時点での VCD。

(6) カスパーゼ 3/7 活性の評価

フェドバッチ培養における細胞のカスパーゼ 3 または 7 の活性を下記手順により評価した。

各条件で3本ずつ培養したフラスコのうち、代表的な1つのフラスコのみ解析に供した。Cell Event™ Caspase 3/7 Green Detection Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用い、取扱説明書記載の手順に従って細胞を蛍光染色した。蛍光染色した細胞液 10 µL を血球計算盤に滴下し、蛍光顕微鏡 EVOS FL Color imaging system (Thermo Fisher Scientific) を用いて観察した。蛍光モードを用いて 470 nm で励起し、生じた 525 nm の蛍光波長を緑色に変換したイメージ画像を取得した。同一の検体について、さらに透過モードで画像を取得し、蛍光モードの画像と重ね合わせた。1 検体について 9 視野ずつ、同様の手法で重ね合わせ画像を取得した。画像の全ピクセル数と緑色のピクセル数を画像解析ソフトウェア ImageJ v. 1.52a software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いてカウントした。その後、総細胞数に対するカスパーゼ 3/7 活性陽性の細胞数の比率を、緑色ピクセル数を総ピクセル数で除することによって算出した。

(7) 培養液成分解析

フェドバッチ培養液中のグルコース、乳酸、グルタミン、グルタミン酸およびアンモニウム濃度をバイオケミストリーアナライザー YSI Model 2700 (YSI Life Sciences, Yellow Springs, OH, USA) を用いて測定した。当装置のグルコース、乳酸、グルタミンおよびグルタミン酸の測定原理は、酵素固定膜を用いた基質の特異的酸化によって生じる H_2O_2 の過酸化水素電極による検出に基づく。またアンモニウムはイオン選択性電極を用いて測定される。各成分の比取込速度及び比生産速度は、培養 0 日目と 2 日目の成分濃度の差を、IVCD で除することによって算出した。

(8) IgG 抗体の N 結合型糖鎖解析

スタウロスポリン濃度 0 nM (コントロール) または 4 nM 処理条件におけるフェドバッチ培養 6 日目の培養液に含まれる IgG 抗体の N 結合型糖鎖分布を下記手順により評価した。各条件で3本ずつ培養したフラスコのうち、代表的な1つのフラスコのみ解析に供した。IgG 抗

体精製用プロテイン A カラムキット Ex-Pure (Kyoto Monotech, Kyoto, Japan) を用いて培養液から IgG 抗体を精製し、EZGlyco® mAb-N kit (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) を用いて N 結合型糖鎖の切り出し及び 2-AB 蛍光色素標識を行なった。蛍光標識した糖鎖溶液を LC-MS (Liquid Chromatography-Mass spectrometry) に供し、LC クロマトグラムにおけるピーク面積が大きい順に 9 ピークを選択して MS スペクトルを取得した。GlycoMod tool (105) を用いて、得られた最大強度 MS シグナルから糖鎖組成を推定した。GlycoMod で提示された複数の糖鎖組成候補のうち、糖タンパク質の糖鎖構造オンラインデータベース UniCarbKB (106) に登録されているものを各ピークの糖鎖組成と判断した。当手法での LC-MS 条件を下記に示す。

使用装置	: LCMS-IT-TOF (Shimadzu)
分析カラム	: ACQUITY UPLC BEH Glycan 1.7 μm ϕ 2.1 $\times$ 150 mm (Waters)
移動相 A	: 0.1%ギ酸 90%アセトニトリル水溶液
移動相 B	: 0.1%ギ酸 40%アセトニトリル水溶液
タイムプログラム	: A/B = 100/0 (0 min) $\rightarrow$ 0/100 (50 min)
流速	: 0.2 mL min ⁻¹
注入量	: 1 μL
蛍光検出	: 励起波長 330 nm および蛍光波長 420 nm
イオン化モード	: エレクトロスプレーイオン化法、負イオン
m/z 測定範囲	: 550–2000

(9) 細胞周期解析

本節 (3) 記載の手法で CHO 細胞液を VCD 1.0×10^6 cell mL⁻¹ になるように調製した。125 mL フラスコに 30 mL ずつ細胞液を分注後、終濃度 0–128 nM になるようにスタウロスポリンを添加し、振盪培養用 CO₂ インキュベーターで培養した。培養 28 時間後に細胞を採取し、BD Cycletest Plus DNA Kit (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて核内

DNA をヨウ化プロピジウムで蛍光染色した。その後、FACS Melody および FlowJo software (Becton, Dickinson and Company) を用いて、取扱説明書記載の手順に従い細胞周期解析に供した。

(10) 統計解析

データは平均値±標準偏差で示し、有意差は両側スチューデントt検定を用いて評価した。平均値の差は $p < 0.05$ で有意、 $p < 0.01$ で著しく有意であると判断した。

第3節 結果

(1) スタウロスポリン有効処理濃度の設定

スタウロスポリンは、5 nM 以上の濃度で CHO 細胞の増殖を阻害した。Figure 9 は、バッチ培養時における 0–300 nM スタウロスポリン処理の影響を示す。5 nM 処理条件では最大 VCD と μ はいずれもコントロール条件よりも大幅に減少したが、1 nM 処理条件では差は生じなかった (最大 VCD: 0 nM; $6.30 \pm 0.15 \times 10^6$ cell mL⁻¹, 1 nM; $6.56 \pm 0.27 \times 10^6$ cell mL⁻¹, $p > 0.05$ 有意差なし, 5 nM; $3.33 \pm 0.18 \times 10^6$ cell mL⁻¹, $p < 0.01$) (μ : 0 nM; 0.625 ± 0.009 day⁻¹, 1 nM; 0.602 ± 0.028 day⁻¹, $p > 0.05$ 有意差なし, 5 nM; 0.457 ± 0.025 day⁻¹, $p < 0.01$)。

10 nM 以上の濃度では、スタウロスポリンは CHO 細胞に対して強い細胞毒性を示したが、5 nM 以下では細胞毒性は観察されなかった。1 nM および 5 nM 処理条件では、培養 2 日目に細胞生存率はわずかに減少したが、培養 6 日目の細胞生存率はコントロール (0 nM) と同程度となった (培養 2 日目細胞生存率: 0 nM; $99.5 \pm 0.1\%$, 1 nM; $96.5 \pm 0.2\%$, $p < 0.01$, 5 nM; $96.4 \pm 0.3\%$, $p < 0.01$) (培養 6 日目細胞生存率: 0 nM; $96.1 \pm 0.2\%$, 1 nM; $96.5 \pm 0.4\%$, $p > 0.05$ 有意差なし, 5 nM; $96.7 \pm 0.6\%$, $p > 0.05$ 有意差なし)。一方、10 nM 以上の条件では、培養 6 日目の細胞生存率は 0–5 nM 処理条件よりも有意に低下した (10–300 nM; $p < 0.01$)。

以上の結果から、1–5 nM の範囲に細胞死誘導を伴わずに細胞周期進行のみを抑制可能な濃度域が存在すると考えられた。追加試験として 1–5 nM 処理条件での細胞増殖性と IgG 生産性に対する影響を評価した (Table 3)。その結果、2–4 nM の濃度範囲において Qp が向上する傾向がみられた (0 nM; 1.05 pg cell⁻¹day⁻¹, 2 nM; 1.22 pg cell⁻¹day⁻¹, 3 nM; 1.27 pg cell⁻¹day⁻¹, 4 nM; 1.22 pg cell⁻¹day⁻¹)。そのため、次に実施したフェドバッチ培養試験では、2–4 nM での CHO 細胞への影響について詳細に評価した。

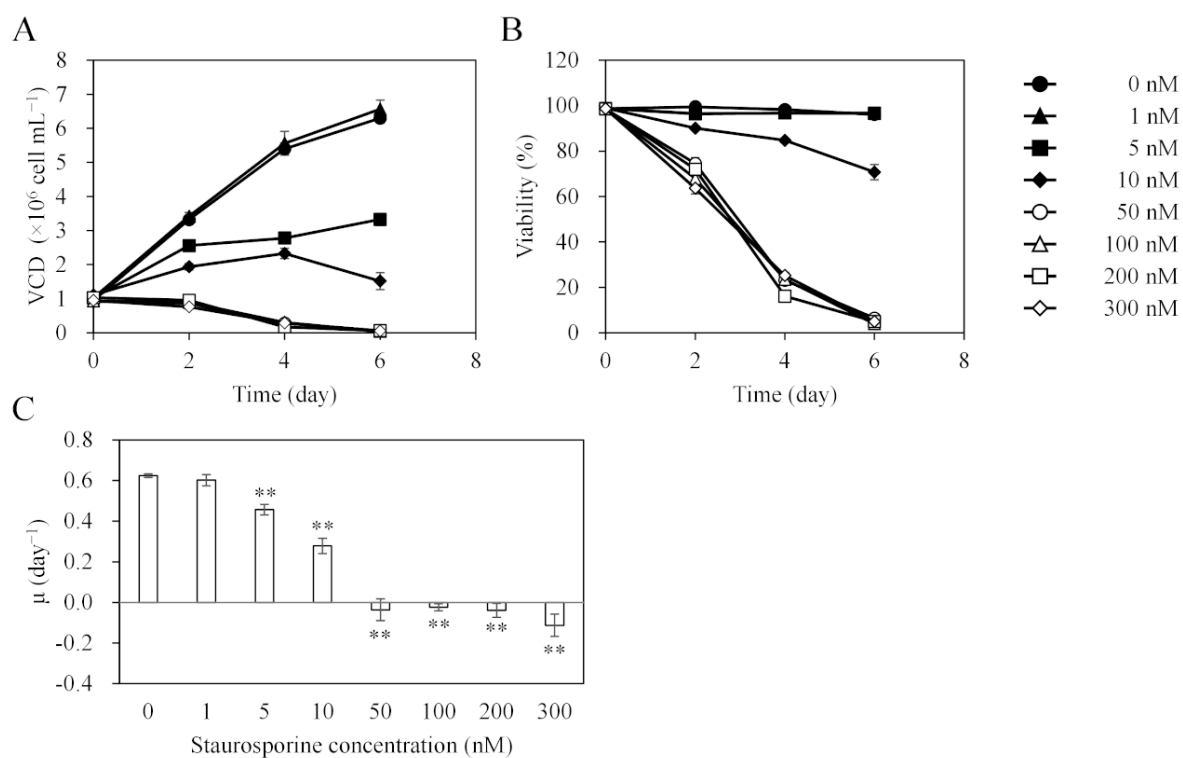


Fig. 9. CHO cell profiles during batch culture with different concentrations of staurosporine.

CHO cells were batch-cultured with 0–300 nM staurosporine in triplicates for 6 days. (A) VCD, (B) cell viability and (C) μ . The average value is indicated by a solid line or column, and the standard deviation is indicated by an error bar. μ was calculated using VCD of day 0 and day 2. For (C), ** $p < 0.01$ compared with the control (0 μ M). VCD, viable cell density; μ , specific growth rate.

Table 3. Effect on cell growth and IgG productivity in the range of 0–5 nM staurosporine.

Staurosporine (nM)	μ (day ⁻¹)	Max VCD ($\times 10^6$ cell mL ⁻¹)	Qp (pg cell ⁻¹ day ⁻¹)	Max IgG conc. (μ g mL ⁻¹)
0	0.626	6.73	1.05	70.5
1	0.624	7.48	1.05	76.7
2	0.538	6.28	1.22	78.2
3	0.442	5.65	1.27	74.0
4	0.430	4.59	1.22	58.6
5	0.413	3.43	1.00	40.8

CHO cells were batch-cultured with 0–5 nM staurosporine. μ was calculated using VCD of day 0 and day 2. The data were obtained from a single experiment. μ , the specific cell growth rate; Max, maximum; VCD, viable cell density; Qp, specific production rate; IgG, immunoglobulin G; conc., concentration.

(2) スタウロスポリン処理による細胞増殖性と IgG 生産性への影響

フェドバッチ培養において、スタウロスポリンは処理濃度依存的に細胞増殖阻害、Qp 向上および細胞寿命改善効果を示した。2–4 nM 処理による VCD、細胞生存率および IgG 濃度の推移を Figure 10 A–C に示す。また、 μ 、最大 VCD、Qp および最大 IgG 濃度を Table 4 に示す。4 nM 処理条件での μ は 0.518 ± 0.011 day⁻¹ であり、コントロール条件 (0 nM; 0.629 ± 0.010 day⁻¹) よりも 17.6%低下した。最大 VCD はコントロールと 2 nM 処理条件ではほぼ同等であった (0 nM; $6.01 \pm 0.13 \times 10^6$ cell mL⁻¹, 2 nM; $6.30 \pm 0.31 \times 10^6$ cell mL⁻¹, $p > 0.05$ 有意差なし)。一方、3 nM および 4 nM 処理条件では最大 VCD は有意に減少した (3 nM; $5.56 \pm 0.24 \times 10^6$ cell mL⁻¹, $p < 0.05$, 4 nM; $4.14 \pm 0.01 \times 10^6$ cell mL⁻¹, $p < 0.01$)。培養経過に伴って生じる細胞生存率

低下とカスパーゼ 3/7 活性の上昇は、共に 2-4 nM スタウロスポリン処理によって濃度依存的に抑制された (Fig. 10B および 10I)。培養終了時 (16 日目) の細胞生存率とカスパーゼ 3/7 活性陽性の細胞比率は、コントロール条件ではそれぞれ $40.0 \pm 0.3\%$ と $50.6 \pm 3.2\%$ であったのに対し、4 nM 処理条件では $90.1 \pm 1.0\%$ ($p < 0.01$) と $6.0 \pm 1.8\%$ ($p < 0.01$) であった。Qp 向上と細胞生存率維持の両方の影響によって IgG 生産量が向上した結果、2 nM、3 nM、および 4 nM 処理条件では最大 IgG 濃度はコントロール比でそれぞれ 16.3%、13.6%、および 5.2% 増加した (0 nM; $115.8 \pm 2.3 \mu\text{g mL}^{-1}$, 2 nM; $134.7 \pm 2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, $p < 0.01$, 3 nM; $131.6 \pm 3.2 \mu\text{g mL}^{-1}$, $p < 0.01$, 4 nM; $121.8 \pm 3.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $p > 0.05$ 有意差なし)。4 nM 処理条件では Qp がコントロール比で 36.3% 向上して最も高くなった一方で、最大 IgG 濃度は 2 nM および 3 nM 処理条件よりも低く、またコントロールと比較して統計学的有意差は生じなかった。これは 4 nM 処理条件では VCD の減少による生産性低下の影響が大きかったためと考えられる。しかしながら、4 nM 処理条件の培養終了時点 (16 日目) での細胞生存率は $90.1 \pm 1.0\%$ と高いレベルを維持していたことから (Fig. 10B)、培養期間延長によって最大 IgG 濃度はさらに増加可能であったと期待できる。

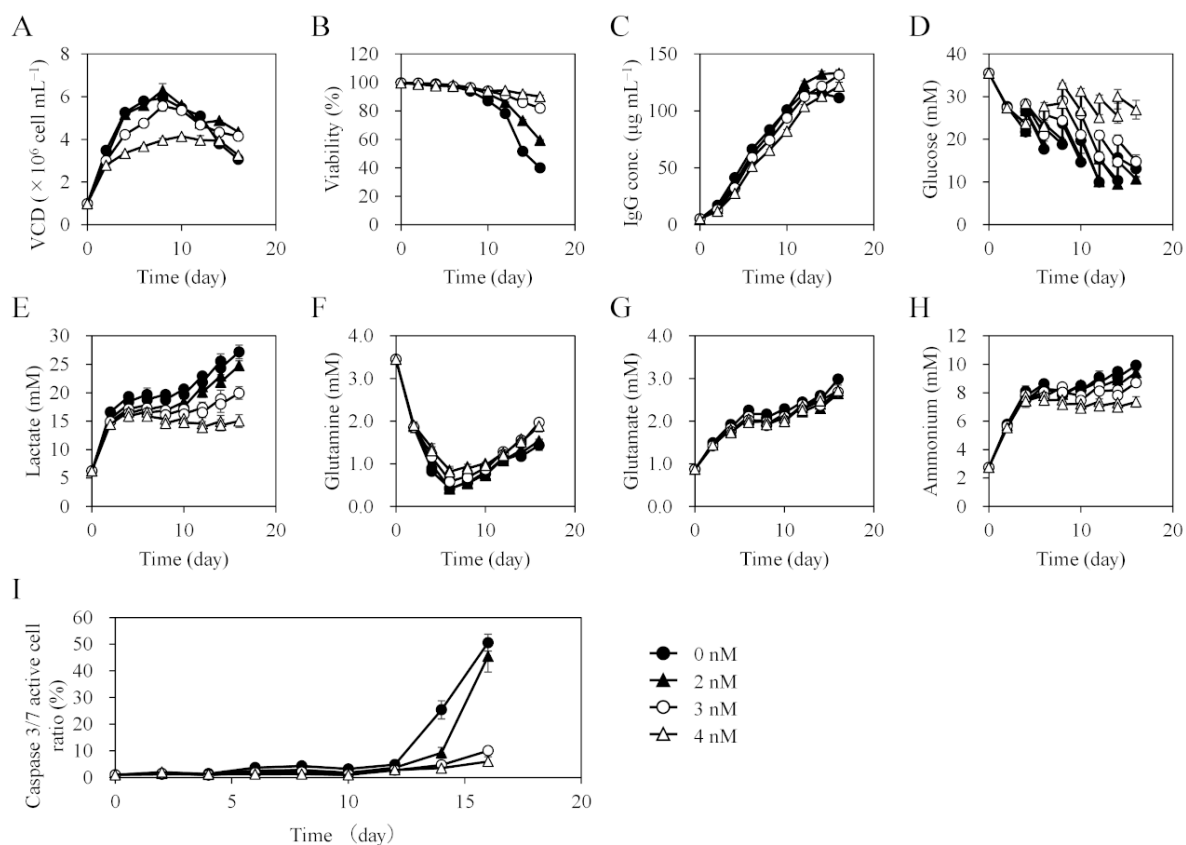


Fig. 10. Time courses of CHO cell culture profiles during fed-batch culture.

CHO cells were fed-batch cultured with 0–4 nM staurosporine in triplicates for 16 days. Time courses of (A) VCD, (B) cell viability, (C) IgG concentration, (D) glucose, (E) lactate, (F) glutamine, (G) glutamate, and (H) ammonium in the culture medium, and (I) caspase 3/7-active cell ratio in the culture. For (A)–(H), the average value from three flasks is indicated by a solid line, and the standard deviation is indicated by an error bar. For (I), caspase 3/7 activity assays were performed in a representative flask for each culture condition. The average value of nine field images is indicated by a solid line, and the standard deviation is indicated by an error bar. VCD, viable cell density; IgG, immunoglobulin G; conc., concentration.

Table 4. Culture profiles of CHO cells during fed-batch culture.

	Staurosporine concentration (nM)			
	0	2	3	4
μ (day ⁻¹)	0.629 ± 0.010	0.577 ± 0.005 **	0.555 ± 0.021 **	0.518 ± 0.011 **
Max VCD (×10 ⁶ cell mL ⁻¹)	6.01 ± 0.13	6.30 ± 0.31	5.56 ± 0.24 *	4.14 ± 0.01 **
Qp (pg cell ⁻¹ day ⁻¹)	1.79 ± 0.02	1.98 ± 0.06 **	2.05 ± 0.02 **	2.44 ± 0.06 **
Max IgG conc. (μg mL ⁻¹)	115.8 ± 2.3	134.7 ± 2.0 **	131.6 ± 3.2 **	121.8 ± 3.5
Q _{glc} (pmol cell ⁻¹ day ⁻¹)	1.75 ± 0.04	1.95 ± 0.06 **	2.04 ± 0.04 **	2.15 ± 0.07 **
Q _{lac} (pmol cell ⁻¹ day ⁻¹)	2.31 ± 0.18	2.23 ± 0.17	2.18 ± 0.27	2.17 ± 0.25
Q _{gln} (pmol cell ⁻¹ day ⁻¹)	0.357 ± 0.025	0.382 ± 0.023	0.400 ± 0.011	0.410 ± 0.022
Q _{glu} (pmol cell ⁻¹ day ⁻¹)	0.139 ± 0.011	0.138 ± 0.003	0.138 ± 0.011	0.151 ± 0.003
Q _{amm} (pmol cell ⁻¹ day ⁻¹)	0.681 ± 0.060	0.716 ± 0.014	0.730 ± 0.030	0.742 ± 0.024

CHO cells were fed-batch cultured in triplicates. Values are represented as means ± standard deviations. μ was calculated using VCD of day 0 and day 2. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with the control (0 μ M). μ , the specific cell growth rate; Max, maximum; Qp, specific production rate; VCD, viable cell density; IgG, immunoglobulin G; conc., concentration; specific uptake or production rate for glucose (Q_{glc}), lactate (Q_{lac}), glutamine (Q_{gln}), glutamate (Q_{glu}), and ammonium (Q_{amm}).

(3) CHO 細胞の代謝への影響

培養液中の乳酸とアンモニウムの蓄積量はスタウロスポリン処理濃度依存的に抑制された。フェドバッチ培養における培地成分濃度の推移と CHO 細胞による比取込速度または比生産速度を Fig. 10 D–H および Table 4 に示す。コントロール条件の培養液中の乳酸およびアンモニウム濃度は、培養終了時点 (16 日目) で 27.16 ± 1.21 mM および 9.94 ± 0.15 mM であった。

一方、4 nM 処理条件の乳酸とアンモニウム濃度はそれぞれ $15.03 \pm 1.14 \text{ mM}$ ($p < 0.01$) および $7.36 \pm 0.37 \text{ mM}$ ($p < 0.01$) であった。グルコース比取込速度はスタウロスポリン処理濃度依存的に増加し、コントロールと比較して有意な差を生じた (0 nM; $1.75 \pm 0.04 \text{ pmol cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$, 2 nM; $1.95 \pm 0.06 \text{ pmol cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$, $p < 0.01$, 3 nM; $2.04 \pm 0.04 \text{ pmol cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$, $p < 0.01$, 4 nM; $2.15 \pm 0.07 \text{ pmol cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$, $p < 0.01$)。乳酸比生産速度、グルタミン比取込速度およびアンモニウム比生産速度はスタウロスポリン処理濃度依存的に減少または上昇する傾向がみられたものの、統計学的に有意な差は生じなかった。またグルタミン酸比生産速度は 4 nM 処理条件では 0–3 nM 処理条件よりも高い傾向がみられたが、こちらも有意な差ではなかった。

(4) IgG 抗体の N 結合型糖鎖分布への影響

糖鎖解析によって、4 nM スタウロスポリン処理は N 結合型糖鎖の分布にほとんど影響しないことが示唆された。Figure 11 はスタウロスポリン 0 nM (コントロール) および 4 nM 処理条件でのフェドバッチ培養 6 日目培養液から得られた N 結合型糖鎖の LC クロマトグラムを示す。また、LC クロマトグラムのピーク面積比率が大きかった 9 ピークの糖組成を Table 5 に示す。この 9 ピークの糖組成は、コントロール条件と 4 nM 処理条件で得られたものとで全て同一であった。さらに、コントロール条件と 4 nM 処理条件とで得られた 9 つのピークのピーク面積比率には高い相関性がみられた (スピアマン順位相関係数 0.983)。これらの結果はクロマトグラム形状の類似性を示し、スタウロスポリン処理が各糖鎖の組成比率に大きく影響しなかったことを示唆する。

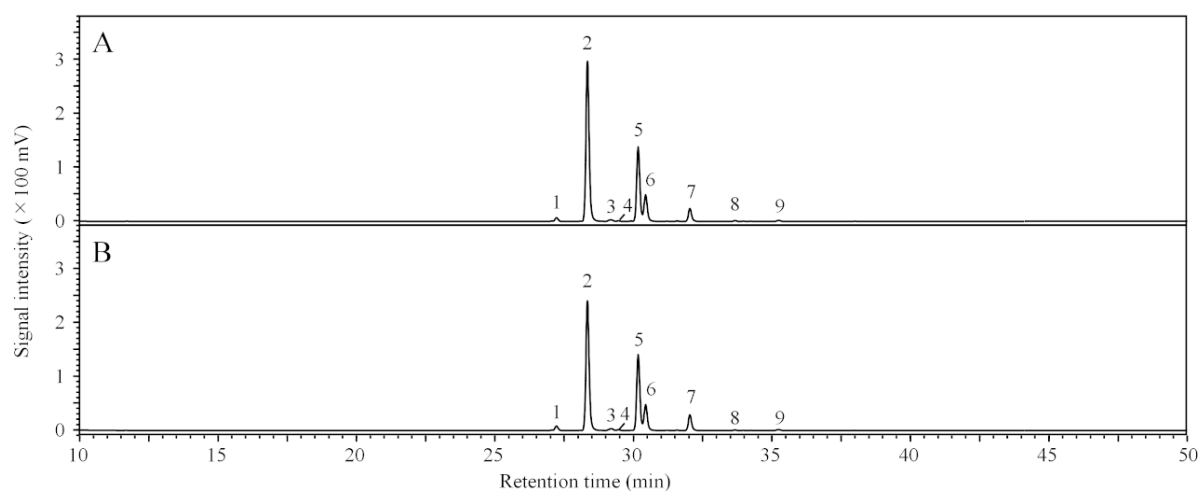


Fig. 11. Liquid chromatography (LC) chromatograms of *N*-linked glycans.

The *N*-linked glycans were obtained on day 6 of fed-batch culture. (A) Without staurosporine (0 nM) and (B) with 4 nM staurosporine. Regarding the numbered peaks, the mass spectra were acquired and determined glycan compositions are shown in Table 5.

Table 5. Profiles of *N*-linked glycans at day 6 of fed-batch culture without or with 4 nM staurosporine.

Peak number	Retention time (min)	Without staurosporine (0 nM)		With 4 nM staurosporine		Ion species	Estimated glycan composition
		Peak area (%)	Observed <i>m/z</i>	Peak area (%)	Observed <i>m/z</i>		
1	27.2	1.3	717.26	1.7	717.26	$[M-2H]^{2-}$	(HexNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
2	28.3	55.9	790.29	50.0	790.29	$[M-2H]^{2-}$	(HexNAc) ₂ (deoxyhexose) + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
3	29.2	0.8	798.28	1.0	798.28	$[M-2H]^{2-}$	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
4	29.5	0.2	798.28	0.3	798.28	$[M-2H]^{2-}$	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
5	30.2	25.7	871.31	28.8	871.31	$[M-2H]^{2-}$	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ (deoxyhexose) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
6	30.4	9.7	871.31	10.4	871.31	$[M-2H]^{2-}$	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ (deoxyhexose) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
7	32.0	4.5	952.33	6.1	952.33	$[M-2H]^{2-}$	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂

							(deoxyhexose) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
8	33.7	0.3	1016.86	0.3	1016.84	[M-2H] ²⁻	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ (deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂
9	35.2	0.5	1097.87	0.5	1097.87	[M-2H] ²⁻	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₁ + (Man) ₃ (GlcNAc) ₂

Mass spectra (MS) of the top nine peaks of liquid chromatography (LC) chromatograms (Fig. 11) were acquired. The retention time and peak area ratio in LC chromatogram, *m/z* value and estimated ion species of the maximum intensity signal in mass spectra, and glycosylation composition which was estimated from MS data, are listed. The peak numbers correspond to those described in Figure 11. The retention times, ion species, and estimated glycan compositions were the same with and without 4 nM staurosporine. Hex, hexose (e.g. mannose, galactose); HexNAc, N-acetylhexosamine (e.g. GlcNAc, GalNAc); deoxyhexose. (e.g. fucose); Man, mannose; GlcNAc, N-acetylglucosamine; NeuAc, N-acetylneuraminic acid.

(5) CHO 細胞の細胞周期分布に及ぼすスタウロsporin 処理の影響

フローサイトメトリー解析によって、スタウロsporin が処理濃度依存的に CHO 細胞の細胞周期に影響することが明らかとなった (Fig. 12)。4 および 8 nM のスタウロsporin 処理によって 28 時間培養後の G1 期細胞比率はコントロール条件 (0 nM) よりも増加し、S 期と G2/M 期の比率は減少した (0nM: G1 期; 44.8%, S 期; 41.8%, G2/M 期; 13.4%) (4nM: G1 期; 54.8%, S 期 39.1%, G2/M 期; 6.1%) (8 nM: G1 期; 55.2%, S 期; 35.5%, G2/M 期; 9.3%)。一方、32 nM 以

上の条件では G1 期と S 期の細胞比率は減少し、G2/M 期の細胞比率が増加した (32 nM: G1 期; 22.8%, S 期; 37.6%, G2/M 期; 39.6%) (64 nM: G1 期; 19.6%, S 期; 34.3%, G2/M 期; 46.1%) (128 nM: G1 期; 21.4%, S 期; 36.8%, G2/M 期; 41.8%)。これらの結果は、8 nM 以下では G1 期での細胞周期停止が誘導され、32 nM 以上の濃度では G2/M 期での細胞周期停止が誘導されたことを示唆する。この結果から、2–4 nM スタウロsporin 処理フェドバッチ培養試験で観察された細胞増殖阻害と Qp 向上には、G1 期の細胞周期停止が関与していると推測した。

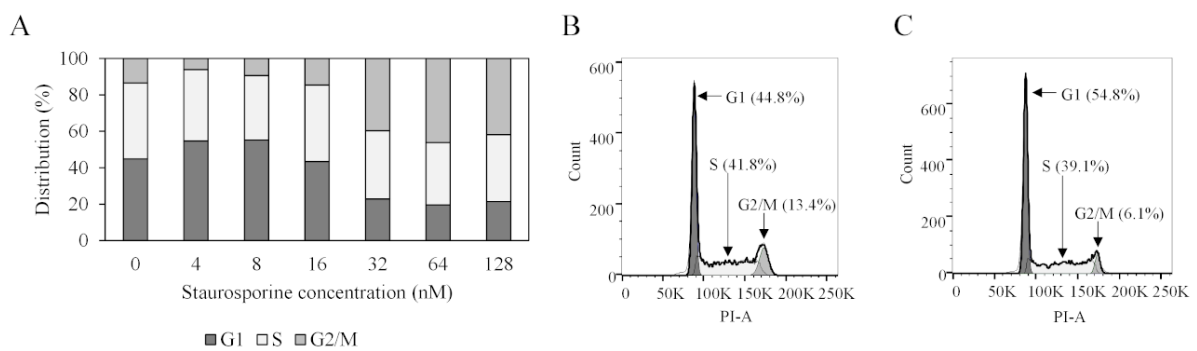


Fig. 12. Cell-cycle distribution of CHO cells treated with staurosporine.

CHO cells were cultured for 28 h with staurosporine concentrations ranging from 0 to 128 nM. (A) Cell cycle distribution at each concentration of staurosporine, (B) cellular DNA histograms without staurosporine (0 nM) and (C) with 4 nM staurosporine.

第4節 考察

本章の研究にて、スタウロスポリン処理によって CHO 細胞の細胞周期停止が誘導され、また停止するフェイズは処理濃度に影響されることが見いだされた。このようなスタウロスポリンの用量依存的な効果は、他の細胞種においても報告されている (74, 75)。ヒトグリオーマ細胞を用いた Yamasaki らの研究では、10 nM 以下のスタウロスポリン処理によって G1 期の細胞周期停止が生じ、30 nM 以上では G2/M 期で細胞周期が停止した (74)。また、ラットの線維芽細胞を用いた Abe らの研究では、1–10 nM のスタウロスポリン処理は G1 期で細胞周期停止を誘導し、その一方で 100 nM 処理は G2 期での細胞周期停止を引き起こした (75)。細胞周期停止のフェイズに対するスタウロスポリンの用量依存的効果から、スタウロスポリン処理濃度の違いは CDK 活性や CKI 発現レベルなどの細胞周期進行に関連する因子に対して異なる影響を与える可能性がある。スタウロスポリン処理濃度と細胞周期進行関連因子への影響については、今後さらなる検証が必要である。

タンパク質生産性の向上を意図した細胞周期停止技術の多くは、G1 期での停止に基づくものである (16)。リボソーム生合成やタンパク質翻訳に関与する様々な遺伝子は、G1 期で発現レベルが向上することから、一般的にはこのフェイズが組換えタンパク質の生産性向上に理想的であると考えられている (16)。しかしながら、タンパク質生産に最適な細胞周期は細胞、生産物の種類、または使用するプロモーターやエンハンサーによっても異なる (107)。例えば、CHO 細胞を用いた Dutton らの研究では組換えジヒドロ葉酸レダクターゼ (dihydrofolate reductase, DHFR) の生産量は S 期で最大となった一方で、組換えヒト組織プラスミノゲン活性化因子 (tissue type plasminogen activator, tPA) は G1 期で主に生産されたことが報告されている (108)。また、組換えヒトインターフェロン γ 生産 CHO 細胞株では、S 期で生産性が最大化された例や (33)、tPA 類似体のパミテプラーゼ生産 CHO 細胞株では G2/M 期で生産性が最大となった例 (107) もある。本章研究では、使用した細胞株の細胞周期と Qp の関係性については調べられていないため、G1 期が生産性において最適かどうかは明確ではない。最適な生産条件は、生産に適した細胞周期の特定と、目的とする細胞周期への制御によっても

たらされる。生産性と細胞周期に関するさらなる研究と、細胞周期の停止フェイズに対するスタウロスポリンの濃度依存性のメカニズム解明によって、任意の細胞周期制御が可能になり、より効率的な生産技術の開発に繋がると期待できる。

スタウロスポリンは強力なアポトーシス誘導物質であることから、細胞生存率を低下させ、目的生産物の総生産量向上に寄与しないリスクも懸念された。スタウロスポリンによるアポトーシス誘導のメカニズムは完全には解明されていないが、ミトコンドリアの脱分極、シトクロム c の放出、およびカスパーゼ 9 の活性化を誘導し、ミトコンドリア経路によるアポトーシス細胞死を誘導すると考えられている (102, 103)。また、スタウロスポリンによって誘導されるアポトーシスではカスパーゼ 3 の活性化を伴うことが報告されている (101, 104)。本章の研究では、アポトーシス誘導の有無をカスパーゼ 3 または 7 の活性を測定することによって評価した。カスパーゼ 3 と 7 はいずれも実行カスパーゼである。外因性および内因性いずれのアポトーシス誘導経路も最終的には実行カスパーゼであるカスパーゼ 3 およびカスパーゼ 7 の活性化を引き起こす (109)。カスパーゼ 3/7 活性測定によって、2-4 nM スタウロスポリン処理条件ではコントロールよりもカスパーゼ 3 またはカスパーゼ 7 の活性が低かったことが示され、アポトーシスは誘導されなかったことが示唆された (Fig. 10I)。それどころか、培養経過に伴って生じる細胞生存率低下とカスパーゼ 3/7 活性の増加は、スタウロスポリン処理濃度に依存して大幅に抑制された。スタウロスポリンがアポトーシス誘導物質であることを考慮すると、この結果は驚くべきものであり、研究開始時には想定していなかったものである。細胞寿命が改善されたメカニズムについて詳細は不明であるが、細胞増殖阻害によって有害な代謝副産物の蓄積が抑制されたことが要因の一つである可能性がある。Figure 10E および 10H に示したように、乳酸とアンモニウムの蓄積はスタウロスポリン処理によって有意に抑制された (培養 16 日目乳酸濃度: 0 nM; 27.16 ± 1.21 mM, 2 nM; 24.78 ± 0.82 mM, $p < 0.05$, 3 nM; 19.94 ± 1.10 mM, $p < 0.01$, 4 nM; 15.03 ± 1.14 mM, $p < 0.01$) (培養 16 日目アンモニウム濃度: 0 nM; 9.94 ± 0.15 mM, 2 nM; 9.43 ± 0.15 mM, $p < 0.05$, 3 nM; 8.71 ± 0.17 mM, $p < 0.01$, 4 nM; 7.36 ± 0.37 mM, $p < 0.01$)。乳酸とアンモニウムの比生産速度に対するスタウロスポリン処理に

よる影響はほとんどなかったため、培養液中のこれらの成分の蓄積量の違いは VCD の違いによるものと考えられる。一般的に、CHO 細胞を含む哺乳類細胞では、乳酸やアンモニウムなどの有害な代謝副産物が培養液中に蓄積することによって、細胞増殖阻害と組換えタンパク質生産性が低下する (110, 111)。また近年では、イソバレレートやインドール 3-乳酸などのアミノ酸代謝副産物や中間体もまた、細胞増殖に阻害的に働くことが報告されている (112)。これらの代謝副産物の生成抑制や、培養系からの除去によって最大 VCD、細胞寿命及び組換えタンパク質の生産性を向上させることが可能である (112–115)。代謝副産物による細胞増殖性やタンパク質生産性への影響の受けやすさは個々の細胞株で異なると考えられるため、使用した CHO 細胞株における細胞寿命延長の要因となりえたかどうかについては今後のさらなる検証を要する。

グルコース比取込速度は 2–4 nM スタウロスポリン処理によって有意に増加した。一方、乳酸比生産速度はコントロール条件とほぼ同等であり、統計学的有意差はみられなかった (Table 4)。この結果は、スタウロスポリン処理が CHO 細胞のグルコース代謝に影響した可能性を示唆する。Wolf らの研究では、ペンタン酸処理による CHO 細胞増殖阻害の結果、グルコース比取込速度は変化せずに乳酸比生産速度のみ有意に減少した (25)。Wolf らはこの要因を、乳酸を生産する解糖経路以外でのグルコース消費量の増加、すなわちペントースリン酸経路へ分岐するグルコースの増加と、解糖系で生じたピルビン酸のトリカルボン酸 (TCA) サイクルへの移行量の増加によるものと推測した。同様に、スタウロスポリン処理による細胞増殖阻害では、グルコースのペントースリン酸経路への分岐とピルビン酸の TCA サイクルへの移行量が増加した可能性がある。また、それに加えて解糖系のグルコース取り込み速度自体も上昇した結果、乳酸比生産速度は変化せず、グルコース比取込速度のみが上昇したと考えられる。

IgG 抗体の重鎖 Fc 領域 (fragment crystallizable region) CH2 ドメインのアスパラギン 297 (EU numbering) に結合する N 結合型糖鎖の構造は、抗体の薬効に強く影響する (116)。抗体の薬効には、ADCC 活性 (antibody-dependent cellular cytotoxicity) や CDC 活性 (complement-

dependent cytotoxicity) などの免疫機能を介した作用が含まれる。ADCC 活性は、糖鎖還元末端 *N* アセチルグルコサミン (*N*-acetylglucosamine, GlcNAc) に結合するフコースの欠如やバイセクティング GlcNAc 残基の付加によって増強される (117–119)。また、糖鎖非還元末端のガラクトース残基の付加は補体第一成分 C1q と CH2 ドメインの結合を高め、CDC 活性を向上させる (120)。一方、Gal α 1-3Gal など、ある種の糖鎖構造は免疫原性を有していることも報告されており (121)、人に投与する際の安全性にも影響する。要求される薬効と品質の達成のために、抗体糖鎖プロファイルは製造工程で厳密に制御される必要がある (122)。培養条件の違いは糖タンパク質の糖鎖構造に影響するため (123–125)、本研究ではスタウロスポリン処理による IgG 抗体の糖鎖分布への影響を調査した。なお、本研究において個別の糖鎖構造ではなく糖鎖分布を評価の対象とした理由は、抗体医薬の製造管理においては不均一性の管理が重要となるためである。動物細胞により生産される mAb には本質的に不均一性が存在するため、医薬品規制当局からは全ての抗体で糖鎖構造が均一であることまでは求められてはいない。厚生労働省の「抗体医薬品の品質評価のためのガイダンス」 (126) には、『抗体医薬品の原薬の製造工程の確立及びその恒常性を示すためには、①目的物質の不均一性の恒常性が保たれていること —中略— を明らかにする必要がある。』、と記載されており不均一性管理の考え方が示されている。そのため本研究では、個別の糖鎖構造の細かい差異ではなく、糖鎖分布を評価対象とした。本研究結果では、4 nM スタウロスポリン処理条件およびコントロール条件で得られた IgG 抗体の糖鎖組成は一致しており、また LC クロマトグラムのピーク面積比率は類似なものであった。これらの結果は、スタウロスポリン処理によって糖鎖分布は実質的に影響を受けなかったことを示唆する。したがって、スタウロスポリン処理は IgG 抗体の薬効と安全性に影響を与えない可能性がある。

本章の研究は、CHO 細胞の細胞死を誘導しない低濃度のスタウロスポリン処理が、*N* 結合型糖鎖の分布に影響せずに IgG 生産性を向上しうることを示し、mAb 生産性向上剤としての利用可能性を示した。また、本研究は CHO 細胞の組換えタンパク質生産性向上のためにスタウロスポリンを用いた初めての試みであり、タンパク質生産性向上剤の開発において新しい

知見を与える。mAb などの医療用タンパク質工業生産のために、スタウロスポリンを用いるためには解決すべき 3 つの課題が残されている。すなわち 1) 生産性向上効果の改善、2) 細胞毒性の低減、および 3) CDK 選択性の向上である。

1) 生産性向上効果の改善

本研究で確認された生産性向上効果 (2–4 nM 処理で最大 IgG 濃度 5.2–16.3% 向上) は、十分高いとは言えない。そのため、生産性向上効果のさらなる改善が必要である。細胞周期停止に基づいた方法は本質的に増殖の阻害、すなわち VCD 減少を伴うものである。しかしながら、VCD の減少はフェドバッチ培養法では培養槽の容量あたりの生産性を低下させるため、本来好ましいものではない。生産性をより一層高めるためには、VCD 減少による負の効果を大幅に上回るほど高い Qp 向上効果が必要である。

2) 細胞毒性の低減

2–4 nM 濃度範囲では顕著な細胞死は見られなかったが、より高濃度の濃度域 (≥ 10 nM) では細胞死が誘導された (Fig. 9B)。そのため、本研究では狭い処理濃度範囲の設定が必要であった。狭い処理濃度範囲の設定は、薬剤の厳密な計量と正確な投入を要求し、従って工場での製造管理の負担を増加させる。また細胞毒性を有する物質は取扱時の粉塵吸引、目や粘膜などへの接触によって作業者に対して重篤な健康被害を及ぼすリスクがある。そのため、作業者保護のための作業手順書や設備、保護具などが必要となり、それも同様に製造管理における負担を増大させる。製造管理負担の増加は製造コストの増加に直結するため好ましくない。使用の簡便さは工業レベルの適用を考える上で重要であり、そのためにはスタウロスポリンの細胞毒性の低下が要求される。

3) CDK 選択性の向上

汎用的なキナーゼ活性阻害はスタウロスポリンの特徴の一つである。しかし、プロテイン

キナーゼの活性は細胞増殖以外にも代謝や生存など様々に影響するため (127)、その非選択的阻害は生産量以外の要求事項、例えば生産物品質などに意図せず影響を及ぼす可能性がある。本研究の結果からは、抗体の糖鎖分布にはスタウロスポリンは影響しないことが示唆された。しかしながら、糖鎖付加率、電荷多様性、また抗体凝集体の含有率などの他の品質指標への影響は評価されていない。品質低下リスクを抑え、堅牢な生産システムとするためには、プロテインキナーゼに対する選択性を向上させる必要がある。特に、細胞周期進行において重要な働きをする CDK に対する選択性の向上が重要である。

これら 3 つの課題を解決する化合物を新たに得るためには、スタウロスポリンの構造修飾や類縁体に対する研究が有効と考えられる。スタウロスポリン類縁体を用いた今後のさらなる研究によって、バイオ医薬の効率的な工業生産技術に資する、新しい化合物が開発可能と期待できる。

第5節 小括

第1章の研究では、海洋由来微生物培養抽出物から mAb 生産性向上に寄与する細胞周期停止化合物の候補をスクリーニングした。その結果、活性化合物候補の一つとしてスタウロスポリンが得られた。本章ではスタウロスポリンについて、組換え CHO 細胞株に対する mAb 生産性向上剤としての利用可能性を検証した。まず初めに、バッチ培養法を用いてスタウロスポリンの最適な添加濃度範囲を調査し、その後、細胞増殖性と mAb 生産性への影響についてフェドバッチ培養法によって評価した。スタウロスポリンは試験に供した CHO 細胞株に対して 10 nM 以上の濃度では細胞死を誘導したが、5 nM 以下ではしなかった。2–4 nM の濃度範囲では、細胞増殖を抑制した一方で、比生産速度 (Qp) と細胞寿命は用量依存的に向上した。2–4 nM スタウロスポリン処理条件での Qp と最大 IgG 濃度はコントロール条件と比較してそれぞれ 10.6–36.3%と 16.3–5.2%¹向上した。また最も生存率低下が抑制された 4 nM スタウロスポリン処理条件では、培養終了時点 (16 日目) の細胞生存率は 90.1 ± 1.0%であり、コントロール条件の細胞生存率 (40.0 ± 0.3%) よりも有意に高い生存率を維持していた。フローサイトメトリー解析は、4 nM スタウロスポリン処理によって G1 期で細胞周期停止が誘導されたことを示唆した。また、4 nM スタウロスポリン処理による糖鎖分布への影響は見られず、抗体品質に影響しない可能性が示唆された。本章の研究は、スタウロスポリン処理が CHO 細胞の細胞周期を停止させ、生産物品質に影響せずに組換え IgG 抗体の生産性を向上しうることを示唆し、化学薬剤法で用いる mAb 生産性向上剤としての利用可能性を示した。しかしながら、スタウロスポリン処理の抗体生産性向上効果は十分高いとは言えず、さらなる改善が必要である。

構造類似の化合物は同様の生理活性を有すると期待できるため、スタウロスポリン類縁体を用いたさらなる研究によってより高い生産性向上効果を有する細胞周期停止化合物を新たに見出せる可能性がある。例えば化学合成法によるスタウロスポリンの構造改変や、CDK 阻

¹ 2 nM 処理条件で 16.3%、4 nM 処理条件で 5.2%向上。

害活性の高いスタウロスポリン類縁体のスクリーニングなどは有効なアプローチと期待できる。しかしながら、スタウロスポリン類縁体による哺乳類細胞の組換えタンパク質生産性に対する作用については未だ報告例がなく、スタウロスポリンと同様に類縁体も **mAb** 生産性向上剤として利用できるかどうかは確認できていない。スタウロスポリン類縁体の有効性を確認するため、次の検討としてスタウロスポリンと構造的類似性を持つヴィオラセインに着目し、スタウロスポリン類縁体も同様に **mAb** 生産性向上剤として利用可能であることの実証を試みた。

第3章 ヴィオラセインの mAb 生産性向上剤としての有効性評価

第1節 緒言

第1章にて海洋由来微生物の培養抽出物から CHO 細胞の mAb 生産性を向上させるための新しい細胞周期停止化合物のスクリーニングを試みた。第2章では、第1章で目的とする活性を有する化合物の候補として得られたスタウロスポリンが CHO 細胞の細胞周期に影響し、mAb の N 結合型糖鎖分布を変えることなく生産性向上をもたらすことを示し、mAb 生産性向上剤として利用できる可能性を示した。しかしながら、スタウロスポリンには mAb 生産性のさらなる向上や細胞毒性の低減など、いくつかの改善すべき課題がある。スタウロスポリン類縁体を用いることで、スタウロスポリンよりも mAb 生産性向上剤としてより優れた細胞周期停止化合物を新たに見出せる可能性がある。本章の研究では、スタウロスポリンと構造的類似性があるヴィオラセインに着目し、ヴィオラセイン処理による組換え CHO 細胞に対する増殖性、生産性及び生産物品質への影響を評価することによって、mAb 生産性向上剤としての利用可能性を検証した。

ヴィオラセインは微生物が産生する紫色色素である。ヴィオラセインとスタウロスポリンは構造的な類似性があり、共にビスインドール化合物である。この両化合物は、L-トリプトファン 2 分子から、共通の生合成経路によって生合成される (Fig. 13) (128)。スタウロスポリンとの構造的類似性は、ヴィオラセインも同様に mAb 生産性向上剤として有効である可能性を示唆する。また、ヴィオラセインには後記の 3 つの特徴がある。これらは、ヴィオラセインが有効かつ安全であり、またさらなる改良余地を持った有望な生理活性化合物であることを期待させる。

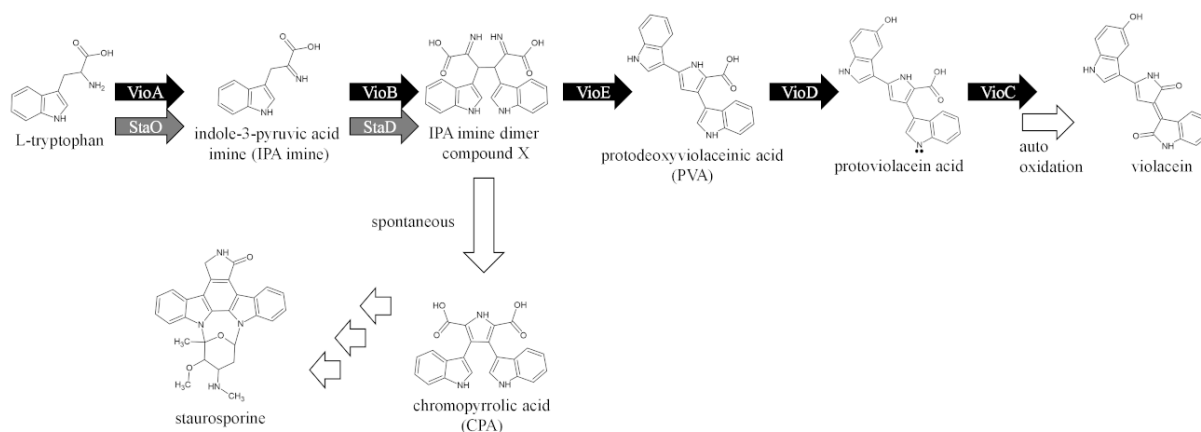


Fig. 13. Biosynthesis pathway of violacein and staurosporine.

The figure was created with reference to Ref. (128, 137).

1) 高い生理活性

ヴィオラセインには、抗細菌、抗寄生虫、抗腫瘍および抗酸化活性などの多様な生理活性があることが報告されている (129, 130)。ヴィオラセインの生理的および薬理的活性の高さはバイオテクノロジー研究素材として魅力的であり、その発見以降、多くの科学者達の興味の対象となっている (129)。その機能性により、ヴィオラセインは医療、織物、化粧品および食品など多岐に渡る産業分野での使用が提案されている (130)。ヴィオラセイン処理による哺乳類細胞の細胞周期停止作用に関する研究報告は未だ限られてはいるものの、Mojib らと Kodach らによってマウス線維肉腫細胞とヒト結腸癌細胞に対する G1 期および G2/M 期での停止誘導作用が報告されている (131, 132)。CHO 細胞の細胞周期に対する作用については知られていないが、ヴィオラセインの高い生理活性と、他の細胞種に関する知見は、この化合物が CHO 細胞に対しても細胞周期停止を誘導できる可能性を示唆する。

2) 哺乳類生体に対する毒性の低さ

ヴィオラセインは、癌細胞に対して細胞毒性を示すことが報告されているが、毒性には細胞依存性があり、通常の細胞に対しては毒性が低い (133, 134)。Ferreira らの研究では、ヴィ

オラセインはヒト白血病細胞 HL60 株に対して、半阻害濃度 (IC_{50}) 700 nM で細胞毒性を示し、アポトーシスを誘導した。一方、通常のヒトリンパ球と単球に対しては試験条件の最大濃度である 2,000 nM まで、細胞毒性はほとんど認められなかった (134)。また Bromberg らの研究では、35 日間連続でマウスにヴィオラセインを最大 $1,000 \mu\text{g kg}^{-1}$ で腹腔内投与した場合においても、血液、腎臓および肝臓に対する毒性を生じなかった (133)。バイオ医薬製造工程での使用を想定した場合、通常の哺乳類細胞や生体組織に対する毒性の低さは、製造作業や投与対象者における安全性の課題を解決するために必要である。

3) 派生物生産に関する豊富な知見

ヴィオラセインの生合成経路は十分良く解明されている。ヴィオラセインは L-トリプトファンを基質とし、5 つの遺伝子 (*vioA*、*vioB*、*vioC*、*vioD*、および *vioE*) によって発現する酵素群によって生合成される (129, 135)。ヴィオラセイン生合成に関わるこれらの酵素の基質特異性は厳密ではない。そのため基質を L-トリプトファンからトリプトファン類縁体に変えることで派生物が生産できる。例えば、L-トリプトファンの代わりの基質として 5-ヒドロキシ-L-トリプトファンを供給することによってヴィオラセインよりも水酸基が 1 つ多いオキシヴィオラセインを生合成することができる (136)。また、ヴィオラセインの類縁体は遺伝子工学的手法によっても生産することができる。例えばヴィオラセインよりも水酸基が一つ少ないデオキシヴィオラセインは *vioD* を除く他の 4 つの遺伝子 (*vioABCE*) を導入することによって選択的に生産できる (Fig. 14) (135, 137)。ヴィオラセインに付加する水酸基の数の違いはその細胞毒性に影響することが報告されている (129, 136)。mAb 生産性向上剤として、仮にヴィオラセインが有効であった場合、次の開発要件としてはその効果の最適化が必要となる。その際、構造改変は有効なアプローチの一つであり、派生物生産に関するこれまでの知見の蓄積は多いに役立つと期待できる。

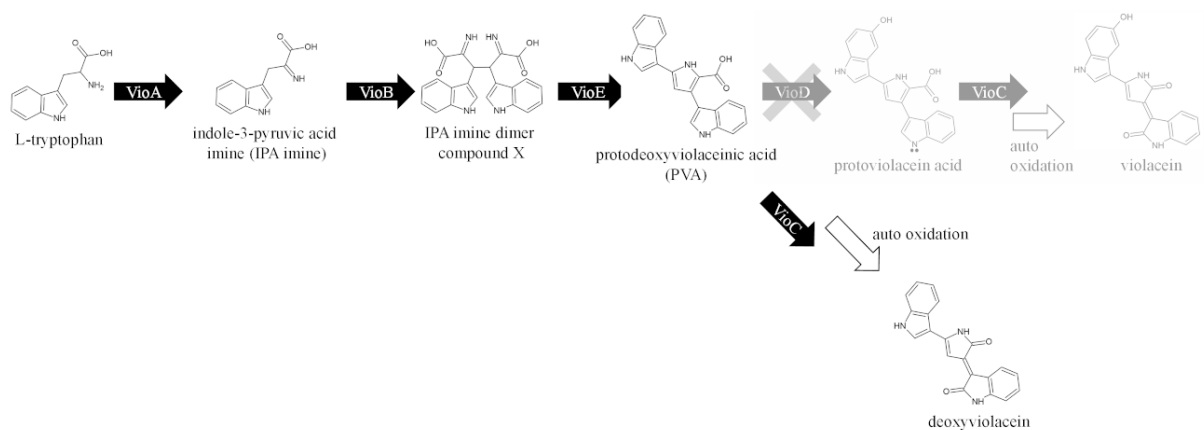


Fig. 14. Deoxyviolacein biosynthetic pathway.

The figure was created with reference to Ref. (135, 137).

上記の理由から、本章ではスタウロスポリン類縁体の中でも特にヴィオラセインに着目し、mAb 生産性向上剤としての効果を検証した。今日まで、ヴィオラセイン処理が組換えタンパク質の生産性に与える影響については、CHO 細胞を含め、いかなる宿主細胞についても報告例がない。本章の研究は、ヴィオラセインの新しい使用法、すなわち組換えタンパク質生産性向上剤としての利用可能性を示し、哺乳類の細胞周期に対するヴィオラセインの作用についての新しい知見を提供する。

第2節 実験材料及び実験方法

(1) 細胞株、使用培地および継代培養条件

第1章及び第2章と同様、ヒト化 IgG1 抗体を生産する遺伝子組換え CHO 細胞株 ATCC® CRL-12445™を用いた。バッチ培養用培地及びフェドバッチ培養用の基礎培地として、第1章第2節記載の Growth A 培地を用いた。またフェドバッチ培養用のフィード培地として、第2章第2節記載の Feed 培地を用いた。試験時の細胞状態を可能な限り統一するため、培養バッチごとに新たな凍結細胞バイアルを用い、3-4回継代培養後に細胞培養試験に用いた。継代培養は第2章第2節で記載した条件と同一で実施した。

(2) ヴィオラセインの調製

高知県室戸岬沖合の深海 320 m から単離された海洋由来ヴィオラセイン産生細菌 *Pseudoalteromonas* 属 520P1 (NBRC 107703, NITE Biological Resource Center, Tokyo, Japan) をヴィオラセイン生産菌として用いた。ヴィオラセインの産生及び精製は Yada らの手法に従った (138)。ヴィオラセイン濃度は、Momen らの方法に従いヴィオラセインの 570 nm 吸光係数を $2.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ として測定した (139)。得られた精製物の組成を日本食品分析センター (Tokyo, Japan) にて定量核磁気共鳴法で解析した結果、ヴィオラセイン 84%、デオキシヴィオラセイン 7%および他成分 9%であった。

(3) バッチ培養

対数増殖期中の CHO 細胞培養液を新しい Growth A 培地と混合して、 $\text{VCD } 1.0 \times 10^6 \text{ cell mL}^{-1}$ になるように調製した。細胞液を 30 mL ずつ 125 mL 三角フラスコ (Corning) に分注した。ヴィオラセインを 100% DMSO (Fujifilm Wako Pure Chemical) に溶解し、ヴィオラセイン終濃度 0.3–2.4 μM 、および DMSO 終濃度 0.1% (v/v) になるように CHO 細胞液に添加した。コントロール条件 (0 μM ヴィオラセイン) としては、細胞液に DMSO のみを終濃度 0.1% (v/v) になるように添加した。その後、各フラスコを振盪培養用 CO_2 インキュベーター (Adolf Kuhner

AG) を用いて、37 °C、5% CO₂、80% 湿度および 120 rpm の条件で 9 日間、回転振盪培養した。各条件につきフラスコを 3 本ずつ用い、並行して培養した (n = 3)。

(4) フェドバッチ培養

本節 (3) 記載の手法で CHO 細胞液を調製し、終濃度 0 μM (コントロール) または 0.9 μM になるようにヴィオラセインを添加した。また、培養 4 日目から培養終了時まで、1 日おきに細胞培養液の 5% 量の Feed 培地を添加しながら、14 日間回転振盪培養した。各条件につきフラスコを 3 本ずつ用い、並行して培養した (n = 3)。

(5) VCD、細胞生存率、および IgG 濃度測定

VCD 及び細胞生存率は Vi-CELL XR (Beckman Coulter) を用いて測定し、IgG 濃度は Octet QKe system (Fortebio) を用いて取扱説明書記載の手法に従って測定した。Qp および μ は、第 2 章第 2 節記載の手法で算出した。

(6) カスパーゼ 3/7 活性の評価

フェドバッチ培養における細胞のカスパーゼ 3 または 7 の活性を第 2 章第 2 節記載の手法により評価した。各培養条件で 3 本ずつ培養したフラスコのうち、代表的な 1 つのフラスコのみ解析に供した。1 検体あたり 3 視野ずつ画像を取得し、総細胞数に対するカスパーゼ 3/7 活性陽性の細胞数の比率を、緑色ピクセル数を総ピクセル数で除することによって算出した。

(7) 培養液成分解析

第 2 章第 2 節と同様の手順で、フェドバッチ培養液中のグルコース、乳酸、グルタミン、グルタミン酸およびアンモニウム濃度を測定した。各成分の比取込速度及び比生産速度は、培養 0 日目と 4 日目の成分濃度の差を、IVCD で除することによって算出した。

(8) IgG 抗体の N 結合型糖鎖解析

ヴィオラセイン濃度 0 μM (コントロール) または 0.9 μM 処理条件のバッチ培養液から、4 日目と 7 日目に IgG 抗体精製用プロテイン A カラムキット Ex-Pure (Kyoto Monotech) を用いて IgG 抗体を精製し、糖鎖解析に供した。EZGlyco[®] mAb-N kit (Sumitomo Bakelite) を用いて、IgG 抗体から N 結合型糖鎖を切り出して 2-AB 蛍光色素標識を行なった。蛍光標識した糖鎖溶液を下記条件で HPLC 解析に供した。各ピークの糖鎖構造は、N 結合型糖鎖標準品 2-AB Glycan Performance Test Standard (Waters) の保持時間と比較することによって推定した。

使用装置	: LC20-AD および RF-20A xs (Shimadzu)
分析カラム	: XBridge Glycan BEH Amide Column, 130A, 2.5 μm , 3.0 $\times$ 150 mm (Waters)
移動相 A	: 50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, pH 4.4
移動相 B	: アセトニトリル
タイムプログラム	: A/B = 25/75 (0 min) $\rightarrow$ 46/54 (56 min)
流速	: 0.7 mL min ⁻¹
注入量	: 2 μL
蛍光検出	: 励起波長 330 nm および蛍光波長 420 nm

(9) 電荷多様性解析

本節 (8) と同様の手順で、ヴィオラセイン濃度 0 μM (コントロール) または 0.9 μM 処理条件のバッチ培養液から、4 日目と 7 日目に IgG 抗体を精製した。キャピラリー等電点電気泳動装置 (capillary isoelectric focusing, cIEF) PA800 plus System (Beckman Coulter) を用いて、取扱説明書記載の手法に従って電荷多様性解析を実施した。cIEF 解析は、pH 勾配を形成した泳動ゲルを用い、タンパク質のアミノ酸構造変化や乖離有無を等電点の違いとして検出する手法である。cIEF クロマトグラムの中で、最もピーク面積が大きなピークを主ピークとし、主

ピークよりも低い等電点を有するピークを酸性異性体、主ピークよりも高い等電点を有するピークを塩基性異性体とした。

(10) IgG mRNA 量測定

ヴィオラセイン濃度 0 μ M または 0.9 μ M 処理条件で、各条件につき 3 フラスコずつ並行してバッチ培養を実施した (n = 3)。培養 4、7 および 9 日目に RNeasy® Mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) を用いて全 RNA を抽出及び精製した。StepOne™リアルタイム PCR システム (ThermoFisher SCIENTIFIC)、Reverse Transcription Master Mix (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA) および SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takara Bio, Kyoto, Japan) を用い、逆転写及び real-time PCR を実施した。IgG 重鎖及び軽鎖のプライマーセットは、Haredy らのプライマー配列情報に従って設計した (140)。内在性コントロールとして、 β -actin 遺伝子を使用した。 β アクチン遺伝子のプライマーセットは、チャイニーズハムスターの β アクチン mRNA 配列情報 (NCBI Reference Sequence: NM_001244575.1) とプライマー設計用ソフトウェア Primer express (ThermoFisher SCIENTIFIC) を用いて設計した。各プライマー配列を Table 6 に示す。IgG 重鎖及び軽鎖遺伝子の mRNA レベルは、0 μ M (コントロール) 条件での培養 4 日目 mRNA 量に対する相対比として $\Delta\Delta C_t$ 法によって算出した。

Table 6. Real time PCR primers.

Target	Primer name	Primer sequence
IgG Heavy Chain	Heavy chain-F	5' -ACGGTGTCGTGGAACCTCAG-3'
	Heavy chain-R	5' -ACGCTGCTGAGGGAGTAGAG-3'
IgG Light Chain	Light chain-F	5' -ACCAAGGTGGAGATCAAACG-3'
	Light chain-R	5' -ATTGAGCAGGCACACAACAG-3'
β -actin	β -actin-F	5' -TGACCCTGAAGTACCCCATTTG-3'

(11) 細胞周期解析

ヴィオラセイン処理による細胞周期への影響を次の2つの手法で評価した。1) 0–1.5 μ M の濃度でヴィオラセインを CHO 細胞液に添加し、バッチ培養条件で 28 時間培養した。その後、BD Cycletest Plus DNA Kit、FACS melody、および FlowJo software (Becton, Dickinson and Company) を用いて、取扱説明書記載の手順に従い細胞周期解析に供した。2) ヴィオラセイン濃度 0 μ M および 0.9 μ M の処理条件で CHO 細胞を 5 日間バッチ培養した。各条件についてフラスコ 3 つずつ並行で培養し ($n = 3$)、培養 1、3 および 5 日目に細胞を採取して細胞周期解析に供した。

(12) 統計解析

データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示し、有意差は両側スチューデント t 検定を用いて評価した。平均値の差は $p < 0.05$ で有意、 $p < 0.01$ で著しく有意であると判断した。

第3節 結果

(1) CHO 細胞に対するヴィオラセインの用量依存的影響

0–2.4 μM の濃度範囲では、ヴィオラセイン処理濃度依存的に CHO 細胞の増殖は阻害された (Fig. 15)。比増殖速度 (μ) と最大生細胞密度 (max VCD) は、それぞれ 0.3 μM 以上および 0.9 μM 以上のヴィオラセイン処理によって有意に低下した (Fig. 15 D および E)。培養 2 日目の細胞生存率は 0.6 μM 以上では処理濃度依存的に低下し、これらの濃度範囲では CHO 細胞に対して細胞毒性があることが示唆された (Fig. 15 F)。0.6–1.5 μM 処理条件では、培養 4 日目以降は培養時間経過に伴って細胞生存率は上昇する傾向を示した。一方、2.4 μM 処理条件の細胞生存率は培養 2 日目に $32.6 \pm 5.3\%$ まで大幅に低下し、その後さらに培養終了時まで継続して減少を続けた。

Q_p は 0.6–1.2 μM 処理条件でコントロール (0 μM) よりも増加した (Fig. 15G)。しかしながら VCD 減少の影響のため、最大 IgG 濃度はいずれの濃度条件においてもコントロールより低かった (最大 IgG 濃度: 0 μM ; $76.0 \pm 2.3 \mu\text{g mL}^{-1}$, 0.6 μM ; 75.4 ± 1.3 , $p > 0.05$ 有意差なし, 0.9 μM ; $68.6 \pm 2.4 \mu\text{g mL}^{-1}$, $p < 0.05$, 1.2 μM ; $48.7 \pm 4.2 \mu\text{g mL}^{-1}$, $p < 0.01$. 各 p 値は 0 μM 条件に対して算出)。

0.9 μM 条件の最大 IgG 濃度はコントロールよりも 9.7%低かった。しかしながら、培養期間延長によって 0.9 μM 条件の IgG 総生産量はコントロール条件よりも上回る可能性がある。0.9 μM 処理条件の Q_p は 1.2 μM 処理条件と同程度に高かった (0.9 および 1.2 μM 処理条件の Q_p の間には統計学的有意差なし)。また、培養終了時点 (9 日目) の細胞生存率は 0.9 μM 処理条件ではコントロールおよび 1.2 μM 処理条件よりも高かった (9 日目生存率: 0 μM ; 86.5 ± 0.3 , 0.9 μM ; 93.7 ± 0.6 , $p < 0.01$, 1.2 μM ; 89.2 ± 0.9 , $p < 0.01$. 各 p 値は 0 μM 条件に対して算出)。さらに、0.9 μM 処理条件は 1.2 μM 処理条件よりも μ の低下レベルが少なく、VCD 低下による総生産量への負の影響が 1.2 μM 処理条件よりも少なかった。既に述べたように、総生産量は Q_p 、VCD 及び培養期間と相関する。そのため、これらの結果は 0.9 μM 処理による IgG 総生産量向上の可能性を強く示唆するものである。次の試験では CHO 細胞における 0.9 μM ヴィ

オラセイン処理の影響について、フェドバッチ培養法にてさらに詳細に調査した。

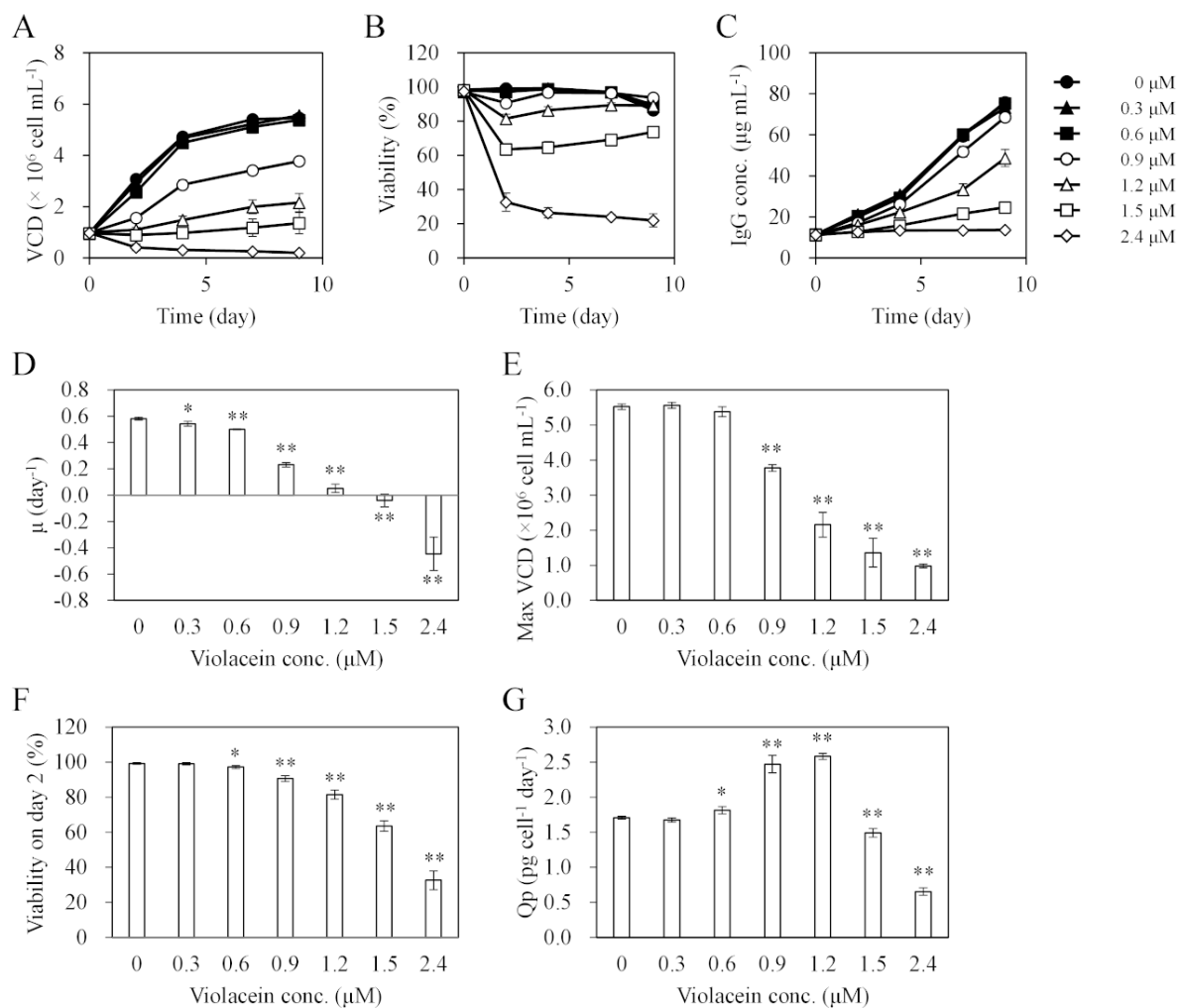


Fig. 15. CHO cell profiles during batch culture with different concentrations of violacein.

CHO cells were batch-cultured with 0–2.4 μM violacein in triplicates for 9 days. (A) VCD, (B) cell viability, (C) IgG concentration, (D) μ , (E) maximum VCD (F) cell viability on day 2, and (G) Qp. μ was calculated using VCD of day 0 and day 2. The average value is indicated by a solid line or column, and the standard deviation is indicated by an error bar. For (D)–(G), * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with the control (0 μM). VCD, viable cell density; IgG, immunoglobulin G; μ , specific growth rate; Qp, specific production rate.

(2) ヴィオラセイン処理による細胞増殖性と IgG 生産性への影響

14 日間のフェドバッチ培養試験では 0.9 μ M ヴィオラセイン処理によって Qp 向上と細胞寿命改善効果がみられ、その結果、最大 IgG 濃度はコントロール条件より 37.6%向上した。Figure 16 と Table 7 に、フェドバッチ培養における CHO 細胞培養プロファイルを示す。0.9 μ M ヴィオラセイン処理条件での μ と最大 VCD はコントロールと比較して 41.2%および 24.4%低下し、その一方で Qp は 70.2%向上した。細胞生存率はヴィオラセイン処理条件では培養 2 日目で低下したが、培養 4 日目以降は上昇し、培養終了時点 (14 日目) ではコントロールよりも有意に高かった (Fig. 16B) (培養 2 日目: 0 μ M; $99.8 \pm 0.1\%$, 0.9 μ M; $92.4 \pm 0.6\%$, $p < 0.01$) (培養 4 日目: 0 μ M; $99.1 \pm 0.2\%$, 0.9 μ M; $97.3 \pm 0.6\%$, $p < 0.01$) (培養 14 日目: 0 μ M; $47.8 \pm 5.3\%$, 0.9 μ M; $77.5 \pm 1.1\%$, $p < 0.01$)。細胞生存率の推移と関連し、カスパーゼ 3/7 活性も経時的に推移した。ヴィオラセイン処理条件ではカスパーゼ 3/7 陽性細胞の比率は培養 2 日目に一時的に上昇したが、培養 4 日目以降は減少した。また、培養最終日 (14 日目) のカスパーゼ 3/7 陽性細胞比率はヴィオラセイン処理条件ではコントロールよりも有意に低かった (Fig. 16I) (培養 2 日目: 0 μ M; $2.2 \pm 0.7\%$, 0.9 μ M; $12.5 \pm 1.4\%$, $p < 0.01$) (培養 4 日目: 0 μ M; $9.3 \pm 2.9\%$, 0.9 μ M; $9.2 \pm 0.9\%$, $p > 0.05$ 有意差なし) (培養 14 日目: 0 μ M; $54.5 \pm 10.0\%$, 0.9 μ M; $3.8 \pm 1.1\%$, $p < 0.01$)。この結果は、ヴィオラセイン処理条件では添加直後に一時的なアポトーシス誘導が生じるものの、培養後半に生じるアポトーシス誘導はコントロールよりも抑制されたことを示唆している。

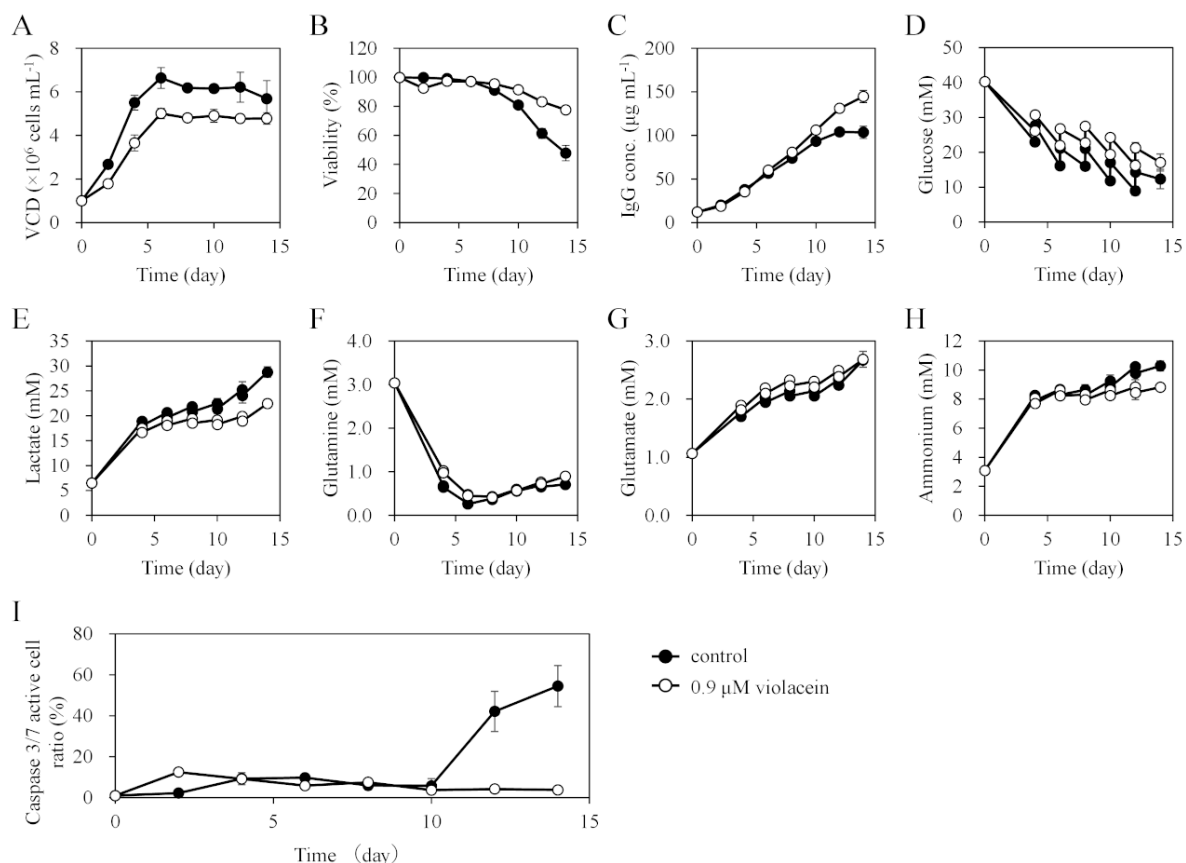


Fig. 16. Time courses of CHO cell culture profiles during fed-batch culture.

CHO cells were fed-batch cultured with or without 0.9 μM violacein in triplicates for 14 days. Time courses of (A) VCD; (B) cell viability; (C) IgG concentration; (D) glucose; (E) lactate; (F) glutamine; (G) glutamate; (H) ammonium; and (I) caspase 3/7 active cell ratio in the culture. For (A)–(H), the average value from three flasks is indicated by a solid line, and the standard deviation is indicated by an error bar. For (I), caspase 3/7 activity assays were performed in a representative flask for each culture condition. The average value of three field images is indicated by a solid line, and the standard deviation is indicated by an error bar. VCD, viable cell density; IgG, immunoglobulin G.

Table 7. Culture profiles of CHO cells during fed-batch culture.

	Without violacein (control)	With 0.9 μ M violacein
μ (day^{-1})	0.490 ± 0.011	$0.288 \pm 0.038^{**}$
Max VCD (10^6 cell mL^{-1})	6.64 ± 0.48	$5.02 \pm 0.22^{**}$
Qp (pg cell $^{-1}$ day $^{-1}$)	1.51 ± 0.06	$2.57 \pm 0.03^{**}$
Max IgG conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	105.1 ± 5.5	$144.6 \pm 7.0^{**}$
Q_{glc} (pmol cell $^{-1}$ day $^{-1}$)	1.46 ± 0.04	$1.72 \pm 0.08^{**}$
Q_{lac} (pmol cell $^{-1}$ day $^{-1}$)	1.05 ± 0.04	$1.34 \pm 0.12^*$
Q_{gln} (pmol cell $^{-1}$ day $^{-1}$)	0.257 ± 0.005	$0.370 \pm 0.021^{**}$
Q_{glu} (pmol cell $^{-1}$ day $^{-1}$)	0.060 ± 0.003	$0.101 \pm 0.003^{**}$
Q_{amm} (pmol cell $^{-1}$ day $^{-1}$)	0.437 ± 0.017	$0.605 \pm 0.046^{**}$

CHO cells were fed-batch cultured in triplicates. Values are represented as means $\pm$ standard deviations. μ was calculated using VCD of day 0 and day 2. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with the control. μ , specific growth rate; Max, maximum; Qp, specific production rate; VCD, viable cell density; IgG, immunoglobulin G; conc., concentration; specific uptake or production rate for Glucose (Q_{glc}), Lactate (Q_{lac}), Glutamine (Q_{gln}), Glutamate (Q_{glu}), and Ammonium (Q_{amm}).

(3) CHO 細胞の代謝への影響

CHO 細胞の代謝速度は、ヴィオラセイン処理によって有意に上昇した (乳酸比生産速度, $p < 0.05$, グルコース、グルタミン、グルタミン酸およびアンモニウムの比取込または比生産速度, $p < 0.01$) (Table 7)。グルコースとグルタミンの比取込速度はコントロールと比較して 17.8% および 44.0% 上昇した。また、乳酸、グルタミン酸およびアンモニウムの比生産速度はそれぞれ

れ 27.6%、68.3%および 38.4%上昇した。代謝速度の増加は、ヴィオラセイン処理による Qp 向上、すなわちタンパク質生産性の向上と関連している可能性がある。哺乳類細胞にとっての有害代謝産物である乳酸とアンモニウムの培養液中の蓄積量は、VCD 低下の影響によってヴィオラセイン処理条件ではコントロールよりも低下した (Fig. 16E および 16H) (培養 14 日目 乳酸濃度: 0 nM; 28.76 ± 1.04 , 0.9 μ M; 22.44 ± 0.85 , $p < 0.01$) (培養 14 日目アンモニウム濃度: 0 nM; 10.28 ± 0.35 mM, 0.9 μ M; 8.82 ± 0.19 , $p < 0.01$)。

(4) ヴィオラセイン処理による CHO 細胞の細胞周期への影響

0.9 μ M ヴィオラセイン処理によって培養 28 時間後の G1 期細胞比率は最も高くなり、コントロールの G1 期細胞比率よりも 16.2%増加した (Fig. 17A) (0 μ M; 34.8%, 0.9 μ M; 51.0%)。S 期比率は 0.9 μ M 以下の濃度では、用量依存的に減少したが、0.9 μ M 以上ではほぼ同等であった (Fig. 17B)。それに対し、G2/M 期比率は 0.9 μ M 以下ではほぼ同等であったが、0.9 μ M 以上では用量依存的に上昇した (Fig. 17C)。これらの結果は、0.9 μ M 以下の濃度域では、G1 期での細胞周期停止が優先的に生じるが、0.9 μ M より高い濃度域では細胞周期停止のフェイズが G1 期から G2/M 期に移行することを示唆している。

Figure 17D–F は、0.9 μ M ヴィオラセイン処理による細胞周期への経時的な影響を示す。ヴィオラセイン処理細胞の G1 期比率は、培養 1 日目ではコントロールに対して有意に増加した (0 μ M; $36.4 \pm 3.5\%$, 0.9 μ M; $50.7 \pm 0.8\%$, $p < 0.01$)、しかし、3 日目以降には有意な差はみられなかった。一方、G2/M 期比率はヴィオラセイン処理細胞では、5 日間の培養期間中、常にコントロール条件よりも有意に高かった (培養 1 日目; $p < 0.05$, 培養 3 および 5 日目; $p < 0.01$)。これらの結果は、ヴィオラセイン処理による G1 期停止誘導は一時的なものであるが、G2/M 期停止はより継続的であり長期間に及ぶ可能性を示唆する。

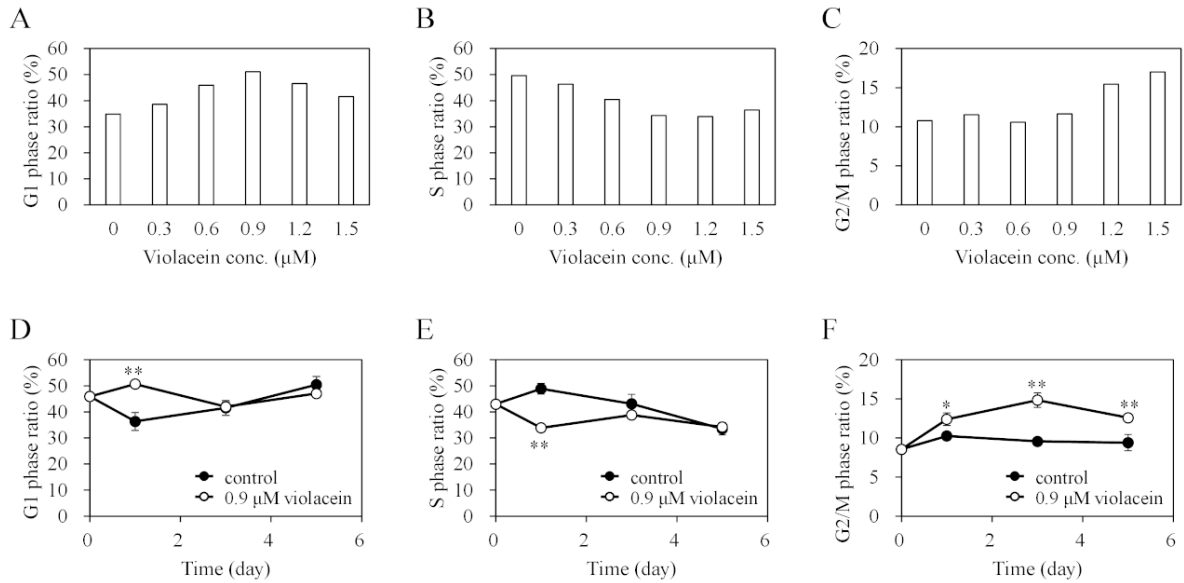


Fig. 17. Cell-cycle distribution of CHO cells treated with violacein.

(A), (B) and (C); Cells were batch-cultured with violacein concentrations ranging from 0 to 1.5 μM , showing G1, S and G2/M phase ratios at 28 h, respectively. The data were obtained from a single experiment. (D), (E) and (F); Cells were batch-cultured with or without 0.9 μM violacein in triplicates for 5 days, showing G1, S and G2/M phase ratios, respectively. The average value is indicated by a solid line, and the standard deviation is indicated by an error bar. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with the control on the corresponding days.

(5) IgG mRNA 転写レベルへの影響

0.9 μM ヴィオラセイン処理によって、バッチ培養 4 日目、7 日目および 9 日目の IgG 重鎖および軽鎖の mRNA 量は有意に増加した。重鎖遺伝子の mRNA 量はコントロールと比較して 47.3–71.1%増加し、軽鎖遺伝子の mRNA 量は 44.4–46.4%増加した (重鎖及び軽鎖の培養 4、7 および 9 日目, 全て $p < 0.01$) (Fig. 18)。この一貫性のある結果は、ヴィオラセイン処理によって IgG 遺伝子の転写は培養期間中継続的に促進されたことを示す。

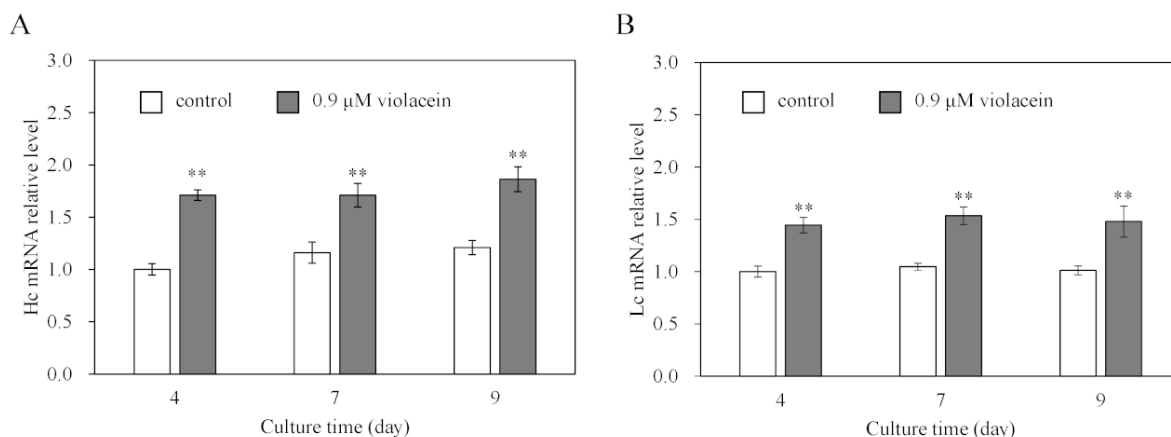


Fig. 18. Effect of violacein on IgG mRNA.

CHO cells were batch-cultured with or without 0.9 μM violacein in triplicates, and IgG mRNA levels were evaluated on day 4, 7, and 9. (A) Heavy chain mRNA. (B) Light chain mRNA. The relative levels compared to the amount of heavy chain or light chain mRNA on day 4 of the control are shown. The average value is indicated by a column, and the standard deviation is indicated by an error bar. ** $p < 0.01$ compared with the control on the corresponding days. IgG, immunoglobulin G; Hc, heavy chain; Lc, light chain.

(6) IgG 抗体の N 結合型糖鎖分布への影響

0.9 μM ヴィオラセイン処理は、IgG 抗体の N 結合型糖鎖分布に対してほとんど影響しなかった。HPLC クロマトグラムを Figure 19 に示す。また、糖鎖標準品との比較によって構造を推定した 13 のピークのピーク面積比率を Table 8 に示す。ヴィオラセイン処理の有無にかかわらず、糖鎖構造としてはコアフコースが付加し、末端ガラクトースを一つも含まない構造 (G0F) の比率が最も高かった。また、G0F、G1F および G2F の 3 つの構造の糖鎖の総ピーク面積比率は全ての条件で 94.3%以上を占めており、この 3 構造が N 結合型糖鎖の大半を占めていた。ヴィオラセイン処理の有無に関わらず、クロマトグラム形状は良く類似しており、ヴィオラセイン処理は抗体 N 結合型糖鎖の分布パターンには大きな影響を及ぼさないことが

示唆された。なお、培養 4 日目のコントロール条件および 0.9 μM ヴィオラセイン処理条件での HPLC クロマトグラム 13 ピークにおいて、ピーク面積比率のスピアマン順位相関係数は 0.980 であった。また、培養 7 日目のピーク面積比率のスピアマン順位相関係数は 0.994 であった。この相関係数の高さはコントロール条件と 0.9 μM ヴィオラセイン処理条件における HPLC クロマトグラムのピークパターンが極めて類似であることを示す。

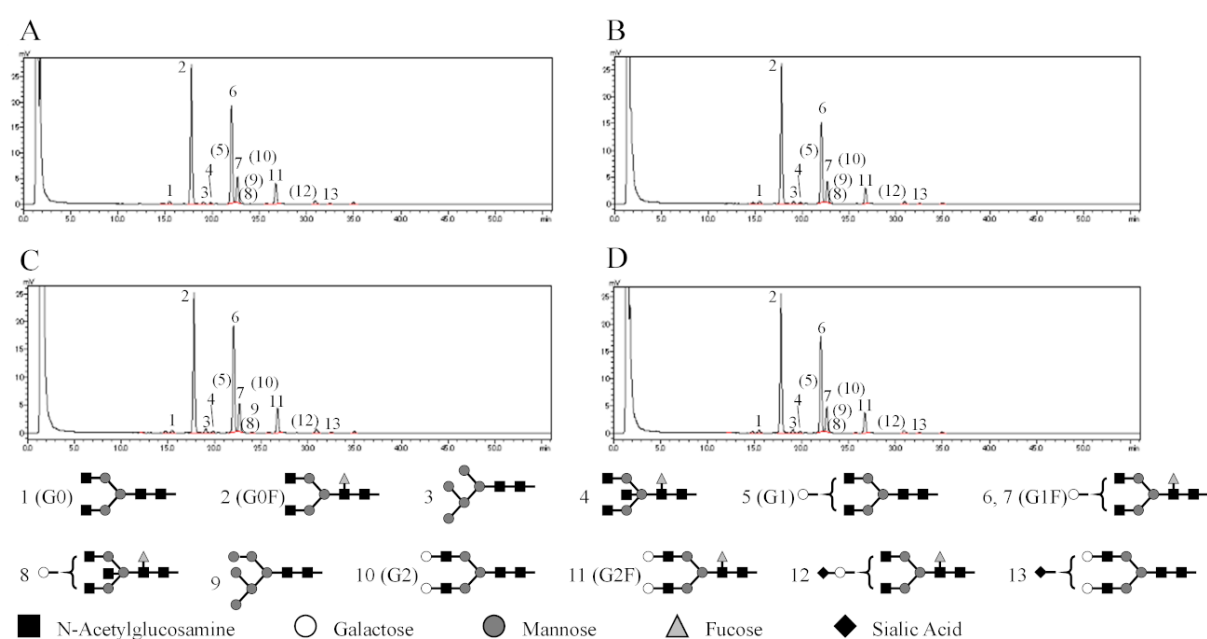


Fig. 19. High performance liquid chromatography chromatograms of *N*-linked glycans.

CHO cells were batch-cultured with or without 0.9 μM violacein, and the *N*-linked glycans of IgG were obtained on day 4 and day 7. The glycan structure of each peak was estimated by comparing with the retention time of the 2-AB Glycan Performance Test Standard (Waters). (A) day 4 and (B) day 7 without violacein (control). (C) day 4 and (D) day 7 with 0.9 μM violacein. The numbers with parentheses show the peak positions that were not detected.

Table 8. Peak area ratios of high-performance liquid chromatography (HPLC) chromatograms.

Peak no.	day 4		day 7	
	control	0.9 μ M violacein	control	0.9 μ M violacein
1	0.8	0.7	0.9	0.8
2	46.1	43.1	51.3	46.3
3	0.6	1.2	0.7	1.1
4	0.4	0.4	0.4	0.5
5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	33.3	33.9	30.5	32.8
7	8.8	8.9	8.2	8.5
8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
9	n.d.	0.2	n.d.	n.d.
10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
11	7.4	8.4	6.2	7.4
12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13	0.2	0.2	0.2	0.2

Peak area ratios (%) of HPLC chromatograms (Fig. 19) are listed. The peak numbers correspond to those described in Figure 19. n.d., not detected.

(7) IgG 抗体の電荷多様性への影響

N 結合型糖鎖分布と同様、0.9 μ M ヴィオラセイン処理は IgG の電荷多様性に対してもほとんど影響しなかった。Figure 20 は電荷異性体と主ピークの構成比率を示す。ヴィオラセイン処理の有無にかかわらず、主ピーク、酸性異性体および塩基性異性体の比率には大きな差異

は認められなかった。また、培養 4 日目と 7 日目の電荷異性体比率はほぼ同等であり、時間経過にともなう変化は観察されなかった。cIEF クロマトグラムもヴィオラセイン処理条件とコントロール条件で極めて類似しており (Fig. 21)、ヴィオラセイン処理は電荷異性体の構成に顕著な影響を与えなかったことが示唆された。

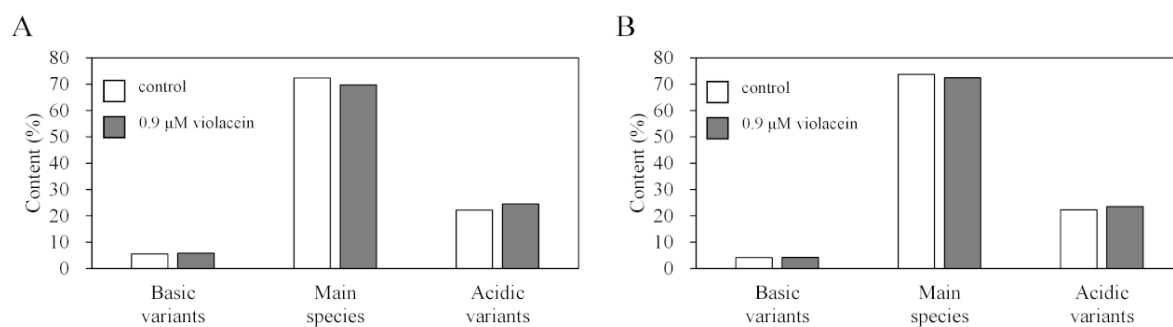


Fig. 20. Effect of violacein on charge variant distribution.

CHO cells were batch-cultured with or without 0.9 μM violacein, and the IgG were obtained on (A) day 4 and (B) day 7. The content of basic variants and acidic variants shows the total value of each isomer. The data were obtained from a single experiment.

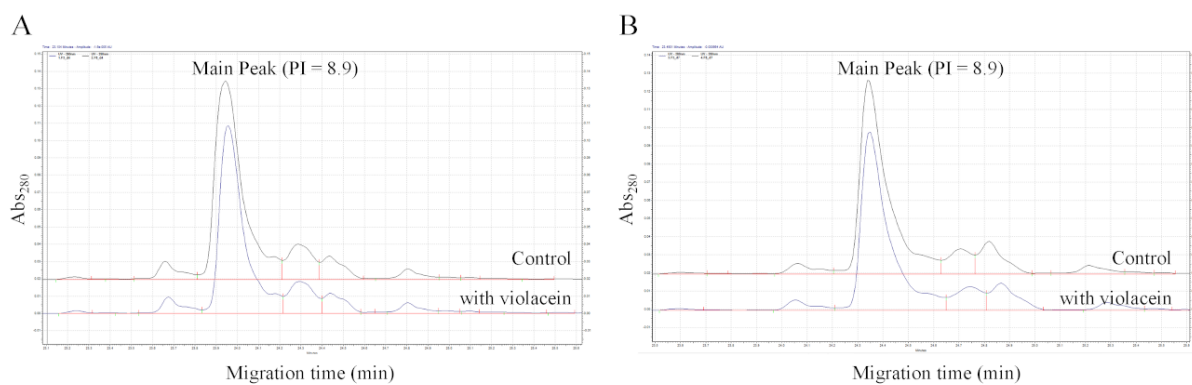


Fig. 21. Capillary isoelectric focusing chromatograms.

CHO cells were batch-cultured with or without 0.9 μ M violacein, and the IgG were obtained on (A) day 4 and (B) day 7. The peaks with migration times earlier than the main peak are basic isomers (larger PI values), and peaks with migration times later than the main peak are acidic isomers (smaller PI values). The data were obtained from a single experiment.

第4節 考察

本章の結果は、ヴィオラセイン処理は抗体品質 (N 結合型糖鎖分布および電荷異性体比率) を変化させずに、IgG 生産性向上と細胞増殖阻害をもたらしたことを示し、ヴィオラセインの mAb 生産性向上剤としての利用可能性を示した。さらに、ヴィオラセイン処理によって CHO 細胞の細胞周期が G1 期と G2/M 期で停止誘導されることが示唆された。ヴィオラセイン処理による細胞増殖阻害と IgG 生産性の向上は、細胞周期停止と関連している可能性がある。ヴィオラセイン処理による G1 期での細胞周期停止は培養 1 日目のみに観察された一時的なものであったが、G2/M 期停止は培養 3 日目以降も継続した。そのため、本研究のバッチ培養及びフェドバッチ培養で観察された IgG 生産性の向上は、G1 期停止よりもむしろ G2/M 期停止の影響である可能性がある。また、観察された IgG mRNA 量と代謝速度の上昇は、ヴィオラセイン処理による Qp 向上と関与していると考えられる。

前述したようにタンパク質生産性を向上させるための既存の細胞周期制御技術の多くは、G1 期での停止をもたらす (16)。既存報告では、化学薬剤法による CHO 細胞の G2/M 期停止による組換えタンパク質生産量向上については、塩化リチウムを用いた Ha らの研究報告があるのみである。塩化リチウムはグリコーゲンシンターゼキナーゼ-3 β の特異的阻害剤であり、G2/M 期での細胞周期停止とアポトーシス誘導の制御に関与する (18)。本章の研究結果は、化学薬剤法による G2/M 期での細胞周期停止が組換えタンパク質生産性向上に有効であることを示す新たな知見となる。

ヴィオラセインが CHO 細胞の細胞周期を停止させる作用機序は現時点では不明である。マウス線維肉腫細胞を用いた Mojib らの研究では *Janthinobacterium* sp.由来のヴィオラセイン様色素²処理は、CDK2、CDK4、CDK6、Cdc2、サイクリン B1 およびサイクリン D1 の発現

² Mojib らの研究では質量分析および ¹H NMR により構造解明を試み、当該色素がヴィオラセインとほぼ同一構造であると推定した。しかしながら特定できない構造部位が一部あったため彼らの論文において「ヴィオラセイン様」と記載されている。

量を減少させた一方で p21、p27 および p53 の発現量を増加させ、G1 期および G2/M 期での細胞周期停止を誘導した (132)。また、Kodach らの研究では、ヴィオラセイン処理は結腸癌細胞において、p21、p27 および p53 の発現量増加およびサイクリン D1 の発現量減少をもたらし、G1 期での細胞周期停止を誘導した (131)。CHO 細胞においても同様に、ヴィオラセイン処理が CDK、サイクリンおよび CKI の発現量に影響した可能性がある。また、強力なプロテインキナーゼ活性阻害剤であるスタウロスポリンとの構造類似性から、CDK の活性阻害によって細胞周期が停止した可能性も考えられる。細胞周期停止の作用機序については、今後、さらなる研究により解明する必要がある。

細胞周期停止化合物の使用に関して、細胞毒性による細胞寿命の減少は解決すべき課題の一つである。本博士論文の序論にて述べたように NaBu は細胞周期停止化合物であり、かつアポトーシス誘導物質である。NaBu によるアポトーシス誘導を回避し、組換えタンパク質生産性向上剤として用いるために、実行カスパーゼ遺伝子のサイレンシングなどの遺伝子工学的手法の併用が検討されている (141)。しかしながら、遺伝子工学的手法は多大な時間と作業的労力を要する上、既に構築された既存の株に対しては適用できない。本研究ではヴィオラセインは一時的なアポトーシス誘導を生じたが、培養時間の経過に伴ってアポトーシスは抑制され、細胞寿命は減少しなかった。使用法の簡便さ、すなわちアポトーシス抑制のために他の手法と組み合わせる必要がないという点は、ヴィオラセインの大きな利点となりうる。

本研究では、ヴィオラセイン処理によって細胞寿命は減少するどころか、むしろ向上した。その理由は不明であるが、次の 3 つの理由が考えられる。

1) 薬剤選択圧による細胞集団構成またはエピジェネティクスの変化

CHO 細胞は異数性の細胞であり、染色体再構築によるゲノム変化や導入遺伝子の変異を起こしやすい。CHO 細胞のゲノムが本質的に柔軟であることは、様々な遺伝子操作や培養条件の変化に対応できる要因ともなっており CHO 細胞の特長とも言えるが、その反面、ゲノム不安定性をもたらし、増殖性や生産性、その他細胞特性の不均一性の要因の一つとなっている

(142)。ゲノム変異に加えて、DNA のメチル化やヒストン修飾などのエピゲノム変異による遺伝子転写のサイレンシングも、表現型を不均一にする原因である。これらの遺伝的および表現型の変化は培養経過に伴って生じることが知られている (142)。近年、厳密な管理がされているはずの、単クローン由来抗体医薬製造用細胞バンクにおいてすらも遺伝的多様性が存在することが報告された (59)。このことから、培養液中の CHO 細胞はある程度の遺伝的及び表現型多様性を有する細胞集団であると考えられる。加えて、本研究で使用した CHO 細胞株はメトトレキサート処理によって遺伝子増幅された株である。メトトレキサート処理は DNA 合成経路を阻害するためゲノム再構築を誘発することが知られている (143)。そのため本研究の使用株は通常のバイオ医薬生産株よりもより一層、遺伝的及び表現型多様性を有していた可能性もある。この多様性によって、培養液中に存在する個々の細胞の生理活性化合物に対する感受性に違いがあり、細胞毎にアポトーシス誘導の起こりやすさが種々異なっていた可能性が考えられる。本章の研究結果では、0.9 μ M ヴィオラセイン処理によって培養 2 日目の細胞生存率は減少し、カスパーゼ 3/7 陽性細胞比率は増加した (Fig. 16B および 16I)。この生存率低下は一時的なものであったが、この時にアポトーシス誘導されやすい細胞の優先的な死が生じた可能性がある。その結果、高アポトーシス耐性細胞が優占的となった細胞集団が形成され、コントロール細胞集団よりも細胞寿命が延長したと推測できる。また、薬剤選択圧に対応して、アポトーシス関連遺伝子に対するエピジェネティックな変化が生じた可能性も考えられる。Feichtinger らは、CHO 細胞のバッチ培養期間中、DNA メチル化パターンの変化はわずかにしか起こらなかった一方、ヒストン修飾パターンは継続的に変化したことを報告した (144)。彼らの研究結果は、短期間の環境変化に対応してヒストン修飾パターンが変化し、遺伝子転写が調節されていることを示唆する。

これらの可能性を検証するためには、シングルセル解析（シングルセルゲノム解析、シングルセルトランスクリプトーム解析、およびシングルセルエピゲノム解析）が有用と期待できる。細胞集団の平均値を解析するバルク解析法とは異なり、シングルセル解析では一細胞レベルでのゲノムや遺伝子発現状態などを評価できる。不均一な細胞集団の解析法として適

しており、ヴィオラセイン処理による細胞群集組成変化を定量的に評価可能である。

2) 細胞生存に関与するキナーゼ活性の変化

Queiroz らはヴィオラセイン処理によって白血病前駆細胞 TF1 のキノームプロファイルが変化したことを報告した (145)。Queiroz らの研究ではヴィオラセイン処理によって TF1 細胞のプロテインキナーゼ A (protein kinase A, PKA)、Akt およびホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ (phosphoinositide-dependent protein kinase, PDK) の活性が増加した。これらのキナーゼ活性の増加は、アポトーシスの抑制と生存促進に作用する。PKA は転写制御因子であるサイクリック AMP 応答配列結合タンパク質 (cAMP response element-binding protein, CREB) をリン酸化し、リン酸化された CREB は様々な遺伝子の転写を促進する。活性化した CREB により発現が亢進されるタンパク質の一つには抗アポトーシス因子である Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) がある (146, 147)。また、PDK と Akt は PI3K (phosphoinositide 3-kinase) 経路の下流に位置するキナーゼである。PDK は重要な生存促進キナーゼである Akt を活性化し、また活性化された Akt は Bad などの BH3-only タンパク質 (Bcl-2 homology domain 3-only proteins) の機能または発現を阻害する (148)。BH3-only タンパク質はアポトーシス促進因子であり、生存促進因子である Bcl-2 ファミリーメンバーに結合して不活化する。そのため、BH3-only タンパク質の機能または発現の阻害は生存に促進的に作用する。さらに、Akt はミトコンドリア経路のイニシエーターカスパーゼであるカスパーゼ 9 をリン酸化してその活性を低下させることや (149)、アポトーシス促進遺伝子の転写制御因子 FOXO (forkhead box O) をリン酸化することによって FOXO を介した転写をブロックすることが報告されている (148)。ヴィオラセイン処理により、上記のような細胞生存促進的なキナーゼ活性の変化によって細胞寿命が向上した可能性が考えられる。

この検証のためには Queiroz らが用いたようなキノームプロファイリングの手法が有用である。現在、リン酸化特異的抗体やペプチドアレイを用い、細胞中の多種多様なキナーゼ活性をハイスループットで評価可能な研究用キットが市販されている。このようなハイスルー

プット評価システムを用いることにより、ヴィオラセイン処理による CHO 細胞のキノームプロファイルの変化を効率的に解析できる。

3) 有害代謝産物の蓄積抑制

第 2 章のスタウロsporin 処理細胞における試験結果と同様、乳酸やアンモニウムなどの有害代謝産物蓄積量の違いが影響した可能性も考えられる。Figure 16E および 16H に示したように、0.9 μM ヴィオラセイン処理条件では、コントロールと比較して乳酸とアンモニウムの蓄積は両方とも抑制された。本研究の使用株における乳酸やアンモニウムなどの代謝副産物による細胞生存率への影響については未評価であるため、この濃度差が実際に細胞生存率に差異を生じうるものかどうかについては今後のさらなる詳細な確認が必要であるものの、細胞寿命に影響する要因の一つになりうる。

この検証のためには、乳酸またはアンモニウム濃度を種々調製した培地を用いた培養評価試験が有用である。これにより、本研究で用いた細胞株の細胞生存率に対して乳酸とアンモニウムが影響する濃度閾値を調査することができる。また、それに加えてヴィオラセイン処理有無における培養液成分推移を LC-MS や GC-MS (Gas Chromatography-Mass spectrometry) で網羅的に解析する手法も有用である。乳酸とアンモニウムは細胞に有害な代謝副産物として代表的ではあるが、前述したイソバレレートやインドール 3-乳酸など、細胞に有害に作用する代謝副産物は他にも存在することが知られている。細胞培養液には多種多様な成分が含まれており細胞生存率に影響を及ぼす成分を特定することは容易ではないが、培養液成分の網羅的解析は各成分による細胞生存率への影響を評価する上で有用な情報を与えるものと期待できる。

ヴィオラセイン処理による細胞寿命改善のメカニズム解明は、製造工程中に生じるアポトーシス誘導を防ぐための新たな技術の開発に資する可能性がある。細胞培養工程中のアポトーシスやネクローシスなどのプログラム細胞死は、VCD や製品品質に影響を及ぼすため、対

処すべき課題の一つである (141)。アポトーシス細胞の増加は、宿主細胞タンパク質 (host cell protein, HCP) の培養液中への放出を引き起こし、また HCP プロファイルの変化をもたらす (150)。さらに培養後期の細胞生存率低下に伴い、生産物の酸性異性体が増加することも報告されている (151)。治療用抗体における電荷異性体や HCP は薬効に影響し、また免疫原性反応を引き起こす場合がある。アポトーシスの抑制は最終製品への不純物残留リスク低下に寄与し、堅牢な製造プロセス構築に貢献する。トランスクリプトーム解析、エピゲノム解析およびキノーム解析は CHO 細胞におけるヴィオラセインの作用機序解明のための有力なツールとなり、またそれらは培養工程中のアポトーシス抑制戦略についての有用な情報をもたらすと期待できる。それにより、例えば NaBu のような他の細胞周期停止化合物によるアポトーシス誘導を回避するための新しい添加手法が見いだせる可能性がある。また、ヴィオラセイン処理によって発現が増加または減少している遺伝子は、アポトーシス耐性と長寿命化に関与している可能性がある。そのため、それらの遺伝子の過発現やノックアウトによって、アポトーシス高耐性株を新たに構築できる可能性もある。そのようなアポトーシス高耐性株は安定生産性に優れた生産宿主となりえるため、生産システムの頑健性向上に寄与すると期待できる。

本章の研究結果は、ヴィオラセインがスタウロスポリンよりも優れた mAb 生産性向上剤になりうることを示唆する。ヴィオラセインはスタウロスポリンの課題の 1 つである生産性向上効果の改善を達成した。前章の研究結果では、2–4 nM スタウロスポリン処理によりコントロール比で最大 IgG 濃度は 16.3–5.2% 向上した。一方、0.9 μ M ヴィオラセイン処理によって最大 IgG 濃度は 37.6% 向上した。培養条件は両試験ともほぼ同等であり、ヴィオラセイン処理はスタウロスポリン処理よりも高い生産性向上効果を示した。ヴィオラセイン処理条件による Qp 向上効果 (コントロール比 70.2% 増) はスタウロスポリン処理条件による効果 (10.6–36.3% 増) よりも高く、この効果の違いが生産性向上効果の違いに寄与したと考えられる。ヴィオラセインはスタウロスポリンと同様に処理濃度依存性が高く、使用可能な濃度範囲は限られていたため細胞毒性に関する課題は完全には解決されていないものの、哺乳類生体に対

する安全性に関する知見もあり (133, 134)、ヴィオラセインは抗体医薬製造工程でスタウロスポリンよりも採用ハードルが低い化合物になる可能性がある。

本章の研究結果は、スタウロスポリン類縁体に着目した研究アプローチによって、mAb 生産性向上に寄与する新たな細胞周期停止化合物を効率的に見出せる可能性を示唆する。スタウロスポリン類縁体に着目したさらなる研究により、有効性、安全性及び使用容易性に優れ、mAb の工業生産現場においてより一層好適な薬剤が開発可能と期待できる。

第5節 小括

前章では、第1章で得られた活性化化合物候補の一つであるスタウロスポリンについて mAb 生産性向上剤としての利用可能性を示した。しかしながら、スタウロスポリンには mAb 生産性のさらなる向上や細胞毒性の低減など、いくつかの改善すべき課題がある。本章の研究では、スタウロスポリンと同様にビスインドール化合物であり、構造的類似性があるヴィオラセインに着目し、mAb 生産性向上剤としての有効性を評価した。14 日間のフェドバッチ培養において、0.9 μ M ヴィオラセイン処理条件では Qp の向上と細胞寿命の改善によって、最大 IgG 濃度がコントロールと比較して 37.6%向上した。細胞周期解析は、ヴィオラセイン処理が CHO 細胞の細胞周期を G1 期と G2/M 期で停止したことを示唆した。G1 期停止は培養 1 日目のみに観察された一時的なものであったが、G2/M 期停止はより長期間継続して起こり、培養 3 日目以降も観察された。このことは、ヴィオラセイン処理による IgG 生産性の向上には G1 期よりも G2/M 期での停止がより大きく関与していることを示唆する。さらに、Qp 向上に伴い、IgG mRNA 発現レベルと代謝速度もまた増加した。N 結合型糖鎖分布と電荷異性体比率はヴィオラセイン処理によってほとんど影響を受けなかった。本章の研究結果は、ヴィオラセインが生産物品質に影響することなく IgG 生産性向上に寄与することを示し、CHO 細胞の mAb 生産性向上剤として利用可能であることを示した。ヴィオラセイン処理による生産性向上効果は、第2章研究におけるスタウロスポリン処理の効果より高く、mAb 生産性向上剤としてスタウロスポリンよりも適している可能性がある。本章の結果は、ヴィオラセインの有効性を示すと共に、スタウロスポリン類縁体に着目した研究アプローチによって、有効性、安全性及び使用容易性に優れ、mAb の工業生産現場においてより一層好適な薬剤を新たに見出せる可能性を示唆する。

第4章 総括

第1節 博士論文まとめ

CHO 細胞は、抗体医薬の原薬となるモノクローナル抗体 (mAb) の主な生産宿主である。CHO 細胞の培養液に細胞周期に影響する薬剤を添加することによって mAb 生産性を向上可能である。しかしながら、この手法は使用薬物による細胞毒性や効果の細胞株依存性が課題である。その解決のため、CHO 細胞の mAb 生産性向上に有効な細胞周期停止化合物を新たに探索し、mAb 生産性向上剤として利用可能か検証した。

第1章では、海洋由来の放線菌および糸状菌の培養抽出物を探索源として、CHO 細胞に対して増殖阻害および mAb 生産性向上効果を示す化合物のスクリーニングを試みた。細胞生存率を損なわずに細胞増殖阻害活性及び抗体生産性向上効果を示す微生物培養抽出物を選別し、分画処理に供した。上記活性を示す画分を特定して活性画分の主成分を活性化合物候補として推定した。その結果、スタウロスポリンを含む6種類の化合物が活性化合物候補として得られた。第2章では、活性化合物候補の一つであるスタウロスポリンについて、mAb 生産性向上剤としての効果を評価した。2–4 nM スタウロスポリン処理によって、細胞生存率を損なうことなく細胞増殖を抑制し、mAb 生産性が向上した。また細胞周期解析によって、4 nM スタウロスポリン処理は CHO 細胞の細胞周期を G1 期で停止することが示唆され、mAb 生産性向上と関連していることが推測された。スタウロスポリン処理による抗体品質 (N 結合型糖鎖分布) への影響は見いだされず、生産物品質に影響を及ぼさないことが示唆された。これらの結果により、スタウロスポリンを mAb 生産性向上に有効な新たな細胞周期停止化合物として利用できる可能性が示唆された。しかしながら、スタウロスポリンには生産性向上効果の改善や細胞毒性の低減などいくつかの課題が残されている。スタウロスポリン類縁体を新たな研究対象とすることで、これらの課題を解決する化合物が見いだせる可能性がある。第3章ではスタウロスポリンと構造的類似性があるヴィオラセインに着目し、mAb 生産性向上剤

としての利用可能性を評価した。その結果、0.9 μ M ヴィオラセイン処理により、細胞増殖阻害と mAb 生産性向上効果が得られることが確認できた。細胞周期解析の結果、ヴィオラセイン処理による G2/M 期での細胞周期停止が生産性向上に寄与した可能性が示唆された。ヴィオラセイン処理による N 結合型糖鎖分布と電荷多様性への影響はみられず、生産物品質にも影響をしないことが示唆された。ヴィオラセイン処理は、スタウロスポリン処理よりも mAb 生産性向上効果が高く、また生体への安全性に関する知見もあるため、化学薬剤法に用いる細胞周期停止化合物としてスタウロスポリンよりも適していると期待できる。

本研究によって、CHO 細胞の組換え mAb 生産性向上に有効な細胞周期停止化合物として、スタウロスポリンおよびその類縁体であるヴィオラセインが有用であることを新たに見出した。スタウロスポリン及びヴィオラセイン処理による CHO 細胞の組換えタンパク質生産性への影響については未だ知見がなく、本研究が初めての報告となる。スタウロスポリン及びヴィオラセインは、CHO 細胞の組換えタンパク質生産性向上のために使用が検討されている短鎖脂肪酸類などの既知薬剤とは大きく異なる構造を有する。そのため、CHO 細胞の細胞周期や組換えタンパク質の生産などに対する作用機序が異なる可能性があり、今まで既知の薬剤では十分な効果が得られなかった細胞株に対しても有効な薬剤となる可能性がある。

第2節 今後の研究への期待

本研究では、スタウロスポリン類縁体としてヴィオラセインに着目してその有用性を示した。今後、ヴィオラセイン以外のスタウロスポリン類縁体にも研究範囲を広げることによって、より一層効果的な mAb 生産性向上剤が開発できる可能性もある。

スタウロスポリンをリード化合物とした薬剤開発は抗ガン剤分野においては既に製薬企業にて進められており、大きな成果が得られている。最も成功した例としては、2001 年に慢性骨髄性白血病 (CML) の治療薬として FDA に承認されたイマチニブ (商品名グリベック、ノバルティス社) である。イマチニブは、スタウロスポリンのフェニルアミノピリミジン誘導体であり (Fig 22)、フィラデルフィア染色体の遺伝子産物である Bcr-Abl チロシンキナーゼを選択的に阻害する。イマチニブは標的に対する選択性が非常に高いため患者への副作用も少ない。治療予後を大幅に改善することができ、CML 治療に革命をもたらした医薬として知られている (152)。イマチニブはキナーゼ阻害薬の先駆けであり、イマチニブの承認後、同様のキナーゼ阻害薬が製薬会社各社より相次いで開発された。また、*N*-ベンゾイルスタウロスポリン (ミドスタウリン) は、選択的キナーゼ阻害剤ではないが、FLT3 チロシンキナーゼに対する高い阻害効果があり、FLT3 変異急性骨髄性白血病に対する治療薬として 2017 年 4 月に FDA の承認を受けた (商品名ライダプト、ノバルティス社) (153)。その他、協和発酵株式会社 (現 協和キリン株式会社) によって開発された 7-ヒドロキシスタウロスポリン (UCN-01) は PKC への選択性が高く、白血病、リンパ腫、固形癌および悪性黒色腫などに対する治療薬として臨床試験が進められている (152, 154)。

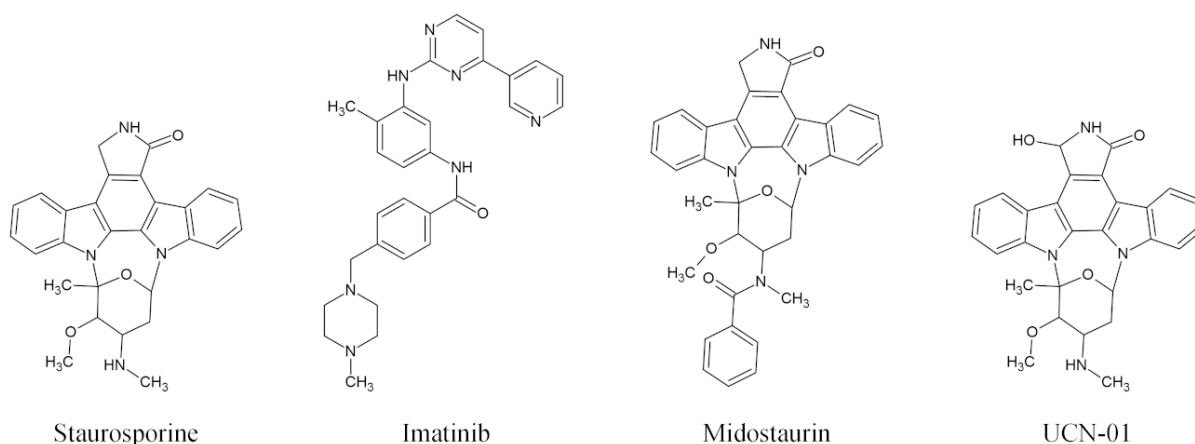


Fig. 22. Structural formulae of staurosporine and the analogs.

スタウロスポリンおよびその類縁体のキナーゼ活性阻害に着目した開発アプローチは、ガン治療薬開発だけでなく CHO 細胞のタンパク質生産性向上剤開発においても有効と考えられる。例えば、細胞周期進行に重要な働きをする CDK をターゲットとして、その選択的な阻害化合物を探索するアプローチは有効な手法の一つである。事実、CDK4/6 に選択的な阻害剤として Du らはピリドピリミジン類化合物を見出し (155)、CDK4/6 の選択的阻害が CHO 細胞の効率的な細胞周期停止と組換え抗体生産性向上に有効であることを示した (20)。一方、近年のガン治療薬の開発アプローチがシングルターゲットからマルチターゲットへと変化しつつあることは、組換えタンパク質生産性向上剤の今後の開発の方向性を検討する上でも考慮すべき動向である。ガン治療分野でのキナーゼ阻害剤開発において、開発当初は「選択的」であることが精力的に追及されてきたが、近年では単一の標的に対する極めて高い選択性は必要なく、むしろ適度な選択性または複数のターゲットに対する選択性を持っている方がガン治療には好ましいのではないかと考え方が変化してきている (152)。生物には頑健性があり、一つの機能を阻害しても他の余剰的／代替的な機能で補うことにより恒常性を維持するからである。ポリファーマコロジーと呼ばれる「一つの薬剤、複数のターゲット」という

医薬開発における新しいコンセプトは、化学薬剤法の課題である効果の細胞株依存性を解決する上でも有効な考え方と期待できる。ある特定の CDK のみに特異的阻害を示す薬剤よりも複数の CDK に同時に作用する薬剤の方が、細胞株の遺伝的および表現型の違いによる影響を低減し、より安定的な効果が得られる可能性がある。スタウロスポリンを基本骨格とした、好適なキナーゼ選択性プロファイルを有する化合物の探索研究は今後の有望な研究アプローチの一つである。

また、新たに見出した活性化合物を実製造工程に用いるためには、薬剤自体の開発にとどまらず、それを有効に活かすための周辺技術も併せて検討する必要がある。例えば、活性化合物の添加方法、適切な除去および残存量評価方法、また効果最大化のための使用方法なども必要な検討課題である。本研究で化合物溶解のために使用した DMSO はバイオ医薬製造現場では使用できない可能性がある。疎水性の活性化合物を工業生産に用いるためには DMSO を用いない代替溶解法が必要である。代替法の一例としては、医療分野で開発されている薬物送達システム (drug delivery system, DDS) が使用できる可能性がある。現在、多糖ナノゲルやリポソームなど、疎水性薬剤を標的細胞に届けるために様々な DDS が開発されている。これら DDS は生体への投与が想定されているため極めて安全性が高い。そのため DDS の使用は、製造工程においても許容される可能性がある。また細胞培養工程で加えた化学薬剤がその後の精製工程で十分に除去できることの実証と、最終製品に残留していないことの保証のための評価手法を確立する必要がある。万が一、培養工程において使用された化学薬剤の最終製品へのキャリーオーバーが生じれば安全性に関する懸念を生じるため (24)、精製工程で適切に取り除く必要がある。現在の mAb 製造工程では、アフィニティクロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィーなどの複数の精製工程を組み合わせた多段階精製工程によって、不純物と生産物を十分良く分離することが可能である (156)。この精製工程は使用した化学薬剤を最終製品から除くためにも有効な可能性があるが、実際の精製工程での除去能については良く確認しておく必要がある。その際の残留性の確認には感度と精度の良い適切な検出方法が必要となる。また、用いる薬剤の効果を最大化するためには、使用株に合わせた最

適な添加濃度と添加タイミングなどの条件検討が必要である。本研究では研究全体を通して、培養開始時に薬剤添加する手法で統一したが、例えば培養途中で添加する方法、複数回に分けて添加する方法、またフィード培地に混ぜて連続的に添加する方法など、添加のタイミング 1 つとっても様々なやり方が想定できる。さらに、本研究では評価しなかったが、薬剤の作用機序によってはフェドバッチ培養法に適した薬剤やパフュージョン培養法に適した薬剤など、培養方法によっても効果の適／不適がある可能性もある。そのため、どのような使用条件で最大の効果が得られるか、またはどのような条件では期待する効果が得られないか、十分良く検証することが技術の実用化に必要となる。

ヴィオラセインを含むスタウロsporin類縁体に関する研究の進展と、新たに見出した薬剤の実用化のための技術開発は、現在の化学薬剤法の課題解決のための一助となり、将来の効率的なバイオ医薬生産技術に資すると期待できる。

補足資料

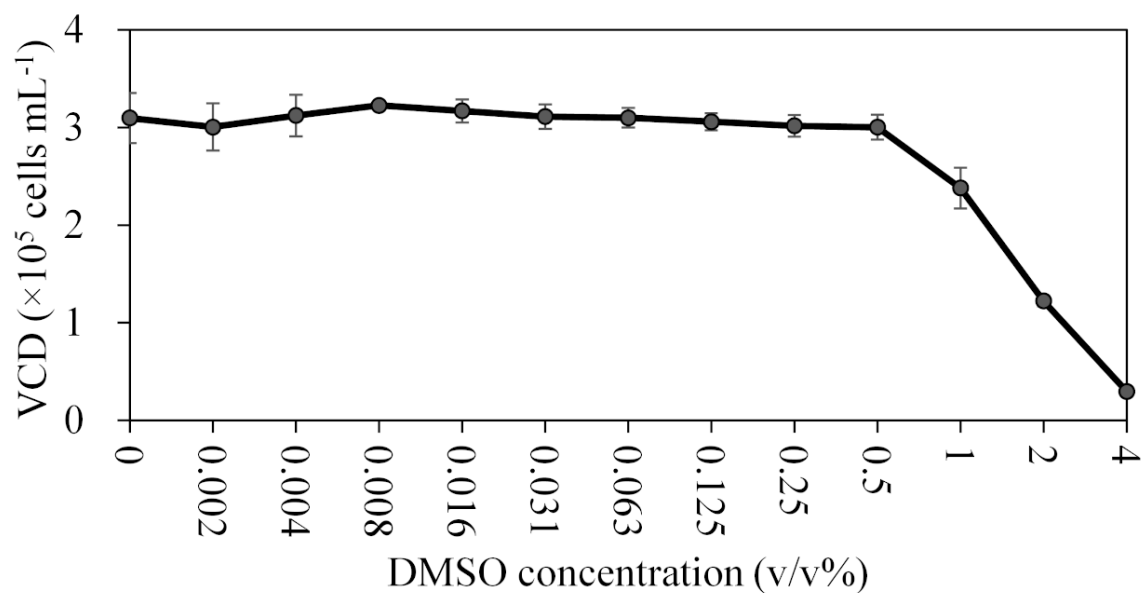


Fig. 1S. Effect of DMSO on CHO cell proliferation.

CHO cells were inoculated at a concentration of 3.0×10^4 cells mL^{-1} into 96-well microplates with 100 μL well $^{-1}$ of culture medium. Then DMSO was added to cultures at final concentrations of 0–4% (v/v). The 96-well plates were incubated in a CO_2 incubator, set at 37 °C and 5% CO_2 , and then VCD was measured at day 5 using Cell Counting Kit 8 (Dojindo Laboratories). The experiments were performed in triplicates per condition ($n = 3$). The average value is indicated by a solid line and the standard deviation is indicated by an error bar. DMSO, dimethyl sulfoxide; VCD, viable cell density.

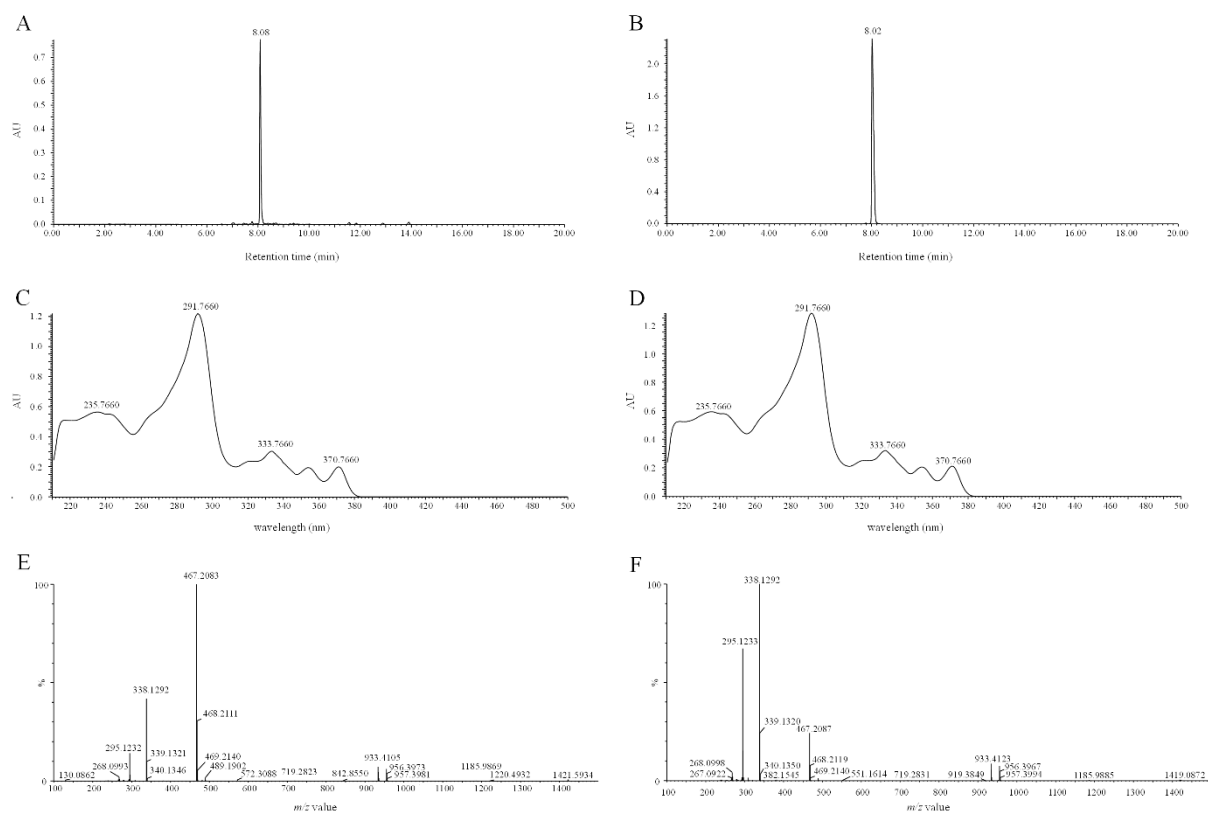


Fig. 2S. Comparison of A370 active fraction and staurosporine.

A370 active fraction and staurosporine were analyzed using LC-MS. Chromatograms with absorbance 280 nm of (A) A370 active fraction, and (B) staurosporine. UV spectrum of (C) A370 active fraction 8.08 minutes peak, and (D) staurosporine 8.02 minutes peak. MS spectrum of (E) A370 active fraction 8.08 minutes peak, and (D) staurosporine 8.02 minutes peak.

Table 1S. Effect of active compound candidates on μ , Qp and cell viability.

Staurosporine (nM)	μ	Qp	Viability
1 nM	94%	108%	101%
2.5 nM	74%	136%	102%
5 nM	64%	109%	102%
10 nM	50%	65%	76%
50 nM	6%	0%	7%

Undecylprodigiosin (nM)	μ	Qp	Viability
10 nM	74%	82%	95%
15 nM	52%	55%	80%
20 nM	9%	49%	77%
50 nM	0%	0%	47%
100 nM	-5%	0%	42%

Cytochalasin E (nM)	μ	Qp	Viability
20 nM	100%	97%	99%
50 nM	89%	99%	97%
100 nM	56%	128%	82%
200 nM	28%	230%	67%
400 nM	-7%	367%	40%
1000 nM	-4%	220%	29%

Staurosporine, undecylprodigiosin and cytochalasin E were added to CHO cell cultures in the same way as in Section 2 (3) of Chapter 2, and incubated 7 days. μ and Qp were calculated as described in Section 2 (5) of Chapter 2. The relative ratios of μ , Qp, and cell viability on day 7 to the control were shown. The data were obtained from single experiment. μ , specific cell growth rate; Qp, specific production rate.

参考文献

1. Leavy O. Therapeutic antibodies: past, present and future. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(5):297.
2. EvaluatePharma. EvaluatePharma World Preview 2019, Outlook to 2024. 12th edition. 2019.
3. 赤羽宏友. バイオ医薬産業の課題と更なる発展に向けた提言. 医薬産業政策研究所リサーチペーパー・シリーズ No. 71. 2018.
4. Pharma Intelligence. Top 10 Best-Selling Drugs of 2018 Fund US and EU PHarma R&D. <<https://pharmaintelligence.informa.com/~media/informa-shop-window/pharma/2019/files/whitepapers/top-10-best-selling-drugs-of-2018-fund-us-and-eu-pharma-rd.pdf>> [accessed on Oct 25, 2020].
5. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature biotechnology*. 2018;36(12):1136-45.
6. Carter PJ, Lazar GA. Next generation antibody drugs: pursuit of the 'high-hanging fruit'. *Nat Rev Drug Discov*. 2018;17(3):197-223.
7. Bielser JM, Wolf M, Souquet J, Broly H, Morbidelli M. Perfusion mammalian cell culture for recombinant protein manufacturing - A critical review. *Biotechnol Adv*. 2018;36(4):1328-40.
8. Shukla AA, Wolfe LS, Mostafa SS, Norman C. Evolving trends in mAb production processes. *Bioeng*

Transl Med. 2017;2(1):58-69.

9. Migliavacca Zucchetti B, Nicolò E, Curigliano G. Biosimilars for breast cancer. Expert opinion on biological therapy. 2019;19(10):1015-21.

10. Biopharm Services. Continuous processing: Part 3. <<https://biopharmservices.com/continuous-processing-part-3/>> [accessed on July 16, 2020].

11. Clincke MF, 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. 2013;29(3):754-67.

12. 国立医薬品食品衛生研究所. これまでに日米欧で承認された抗体医薬品. <<http://www.nihs.go.jp/dbcb/TEXT/mab-t1-190501.pdf>> [accessed on July 16, 2020].

13. Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. J Exp Med. 1958;108(6):945-56.

14. Xu X, Nagarajan H, Lewis NE, Pan S, Cai Z, Liu X, *et al.* The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. Nature biotechnology. 2011;29(8):735-41.

15. Yang WC, Lu J, Nguyen NB, Zhang A, Healy NV, Kshirsagar R, *et al.* Addition of valproic acid to CHO cell fed-batch cultures improves monoclonal antibody titers. Mol Biotechnol. 2014;56(5):421-8.

16. Kumar N, Gammell P, Clynes M. Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture : A summary of recent methods employed and the effects of proliferation control in product secreting CHO cell lines. *Cytotechnology*. 2007;53(1-3):33-46.
17. Sunley K, Butler M. Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. *Biotechnol Adv*. 2010;28(3):385-94.
18. Ha TK, Kim YG, Lee GM. Effect of lithium chloride on the production and sialylation of Fc-fusion protein in Chinese hamster ovary cell culture. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(22):9239-48.
19. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, *et al*. 分子細胞生物学 第 8 版. 東京: 株式会社東京化学同人; 2019.
20. Du Z, Treiber D, McCarter JD, Fomina-Yadlin D, Saleem RA, McCoy RE, *et al*. Use of a small molecule cell cycle inhibitor to control cell growth and improve specific productivity and product quality of recombinant proteins in CHO cell cultures. *Biotechnol Bioeng*. 2015;112(1):141-55.
21. Clincke MF, Mölleryd C, Samani PK, Lindskog E, Fäldt E, Walsh K, *et al*. Very high density of Chinese hamster ovary cells in perfusion by alternating tangential flow or tangential flow filtration in WAVE Bioreactor™-part II: Applications for antibody production and cryopreservation. *Biotechnol Prog*. 2013;29(3):768-77.
22. Xu S, Jiang R, Chen Y, Wang F, Chen H. Impact of Pluronic((R)) F68 on hollow fiber filter-based perfusion culture performance. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2017;40(9):1317-26.

23. Lin H, Leighty RW, Godfrey S, Wang SB. Principles and approach to developing mammalian cell culture media for high cell density perfusion process leveraging established fed-batch media. *Biotechnol Prog.* 2017;33(4):891-901.
24. Wang SB, Lee-Goldman A, Ravikrishnan J, Zheng L, Lin H. Manipulation of the sodium-potassium ratio as a lever for controlling cell growth and improving cell specific productivity in perfusion CHO cell cultures. *Biotechnol Bioeng.* 2018;115(4):921-31.
25. Wolf MKF, Closet A, Bzowska M, Bielser JM, Souquet J, Broly H, *et al.* Improved Performance in Mammalian Cell Perfusion Cultures by Growth Inhibition. *Biotechnol J.* 2019;14(2):e1700722.
26. Yoon SK, Kim SH, Lee GM. Effect of low culture temperature on specific productivity and transcription level of anti-4-1BB antibody in recombinant Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Prog.* 2003;19(4):1383-6.
27. Yoon SK, Song JY, Lee GM. Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng.* 2003;82(3):289-98.
28. Kaufmann H, Mazur X, Fussenegger M, Bailey JE. Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. *Biotechnol Bioeng.* 1999;63(5):573-82.
29. Fox SR, Patel UA, Yap MG, Wang DI. Maximizing interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: experimental and modeling. *Biotechnol Bioeng.* 2004;85(2):177-84.

30. Nishiyama H, Itoh K, Kaneko Y, Kishishita M, Yoshida O, Fujita J. A glycine-rich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth. *J Cell Biol.* 1997;137(4):899-908.
31. Matijasevic Z, Snyder JE, Ludlum DB. Hypothermia causes a reversible, p53-mediated cell cycle arrest in cultured fibroblasts. *Oncol Res.* 1998;10(11-12):605-10.
32. Ohnishi T, Wang X, Ohnishi K, Takahashi A. p53-dependent induction of WAF1 by cold shock in human glioblastoma cells. *Oncogene.* 1998;16(11):1507-11.
33. Fox SR, Tan HK, Tan MC, Wong SC, Yap MG, Wang DI. A detailed understanding of the enhanced hypothermic productivity of interferon-gamma by Chinese-hamster ovary cells. *Biotechnol Appl Biochem.* 2005;41(Pt 3):255-64.
34. Kou TC, Fan L, Zhou Y, Ye ZY, Liu XP, Zhao L, *et al.* Detailed understanding of enhanced specific productivity in Chinese hamster ovary cells at low culture temperature. *J Biosci Bioeng.* 2011;111(3):365-9.
35. Oguchi S, Saito H, Tsukahara M, Tsumura H. pH Condition in temperature shift cultivation enhances cell longevity and specific hMab productivity in CHO culture. *Cytotechnology.* 2006;52(3):199-207.
36. Kim HS, Lee GM. Differences in optimal pH and temperature for cell growth and antibody production between two Chinese hamster ovary clones derived from the same parental clone. *J*

Microbiol Biotechnol. 2007;17(5):712-20.

37. Bi JX, Shuttleworth J, Al-Rubeai M. Uncoupling of cell growth and proliferation results in enhancement of productivity in p21CIP1-arrested CHO cells. Biotechnol Bioeng. 2004;85(7):741-9.

38. Mazur X, Fussenegger M, Renner WA, Bailey JE. Higher productivity of growth-arrested Chinese hamster ovary cells expressing the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. Biotechnol Prog. 1998;14(5):705-13.

39. Fussenegger M, Mazur X, Bailey JE. A novel cytostatic process enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells. Biotechnol Bioeng. 1997;55(6):927-39.

40. Carvalhal AV, Santos SS, Calado J, Haury M, Carrondo MJ. Cell growth arrest by nucleotides, nucleosides and bases as a tool for improved production of recombinant proteins. Biotechnol Prog. 2003;19(1):69-83.

41. 医薬品医療機器総合機構. 生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品）の製造工程の変更にもなう同等性／同質性評価．
<<https://www.pmda.go.jp/files/000156276.pdf>> [accessed on July 16, 2020].

42. Park JH, Noh SM, Woo JR, Kim JW, Lee GM. Valeric acid induces cell cycle arrest at G1 phase in CHO cell cultures and improves recombinant antibody productivity. Biotechnol J. 2016;11(4):487-96.

43. Hendrick V, Winnepeninckx P, Abdelkafi C, Vandeputte O, Cherlet M, Marique T, *et al.*

Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: a cell cycle phases analysis. *Cytotechnology*. 2001;36(1-3):71-83.

44. Bora-Tatar G, Dayangaç-Erden D, Demir AS, Dalkara S, Yelekçi K, Erdem-Yurter H. Molecular modifications on carboxylic acid derivatives as potent histone deacetylase inhibitors: Activity and docking studies. *Bioorg Med Chem*. 2009;17(14):5219-28.

45. Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res*. 2007;5(10):981-9.

46. Nolan L, Johnson PW, Ganesan A, Packham G, Crabb SJ. Will histone deacetylase inhibitors require combination with other agents to fulfil their therapeutic potential? *Br J Cancer*. 2008;99(5):689-94.

47. Zhou Q, Dalgard CL, Wynder C, Doughty ML. Histone deacetylase inhibitors SAHA and sodium butyrate block G1-to-S cell cycle progression in neurosphere formation by adult subventricular cells. *BMC Neurosci*. 2011;12:50.

48. Buquet-Fagot C, Lallemand F, Charollais RH, Mester J. Sodium butyrate inhibits the phosphorylation of the retinoblastoma gene product in mouse fibroblasts by a transcription-dependent mechanism. *J Cell Physiol*. 1996;166(3):631-6.

49. Qiu J, Gao Z, Shima H. Growth of human prostate cancer cells is significantly suppressed in vitro with sodium butyrate through apoptosis. *Oncol Rep*. 2012;27(1):160-7.

50. Damiani R, Almeida BE, Oliveira JE, Bartolini P, Ribela MT. Enhancement of human thyrotropin synthesis by sodium butyrate addition to serum-free CHO cell culture. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2013;171(7):1658-72.
51. Mimura Y, Lund J, Church S, Dong S, Li J, Goodall M, *et al*. Butyrate increases production of human chimeric IgG in CHO-K1 cells whilst maintaining function and glycoform profile. *J Immunol Methods*. 2001;247(1-2):205-16.
52. Oh HK, So MK, Yang J, Yoon HC, Ahn JS, Lee JM, *et al*. Effect of N-Acetylcystein on butyrate-treated Chinese hamster ovary cells to improve the production of recombinant human interferon-beta-1a. *Biotechnol Prog*. 2005;21(4):1154-64.
53. Yin B, Wang Q, Chung CY, Ren X, Bhattacharya R, Yarema KJ, *et al*. Butyrate ManNAc analog improves protein expression in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*. 2018;115(6):1531-41.
54. Kim YG, Kim JY, Lee GM. Effect of XIAP overexpression on sodium butyrate-induced apoptosis in recombinant Chinese hamster ovary cells producing erythropoietin. *J Biotechnol*. 2009;144(4):299-303.
55. Hong JK, Lee GM, Yoon SK. Growth factor withdrawal in combination with sodium butyrate addition extends culture longevity and enhances antibody production in CHO cells. *J Biotechnol*. 2011;155(2):225-31.
56. Jeon MK, Lee GM. Correlation between enhancing effect of sodium butyrate on specific productivity and mRNA transcription level in recombinant Chinese hamster ovary cells producing

antibody. J Microbiol Biotechnol. 2007;17(6):1036-40.

57. Yamano N, Omasa T. EGCG improves recombinant protein productivity in Chinese hamster ovary cell cultures via cell proliferation control. Cytotechnology. 2018;70(6):1697-706.

58. Bandyopadhyay AA, O'Brien SA, Zhao L, Fu HY, Vishwanathan N, Hu WS. Recurring genomic structural variation leads to clonal instability and loss of productivity. Biotechnol Bioeng. 2019;116(1):41-53.

59. Scarcelli JJ, Hone M, Beal K, Ortega A, Figueroa B, Starkey JA, *et al.* Analytical subcloning of a clonal cell line demonstrates cellular heterogeneity that does not impact process consistency or robustness. Biotechnol Prog. 2018;34(3):602-12.

60. Siminovitch L. On the nature of heritable variation in cultured somatic cells. Cell. 1976;7(1):1-11.

61. Demain AL, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. J Antibiot (Tokyo). 2009;62(1):5-16.

62. Berdy J. Bioactive microbial metabolites. J Antibiot (Tokyo). 2005;58(1):1-26.

63. Newman DJ, Hill RT. New drugs from marine microbes: the tide is turning. Journal of industrial microbiology & biotechnology. 2006;33(7):539-44.

64. Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, *et al.* Environmental

genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*. 2004;304(5667):66-74.

65. Jensen PR, Mincer TJ, Williams PG, Fenical W. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2005;87(1):43-8.

66. Liu X, Ashforth E, Ren B, Song F, Dai H, Liu M, *et al*. Bioprospecting microbial natural product libraries from the marine environment for drug discovery. *J Antibiot (Tokyo)*. 2010;63(8):415-22.

67. Lim H, Kim MK, Lim Y, Cho YH, Lee CH. Inhibition of cell-cycle progression in HeLa cells by HY52, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor isolated from *Bauhinia forficata*. *Cancer Lett*. 2006;233(1):89-97.

68. El-Damasy AK, Seo SH, Cho NC, Kang SB, Pae AN, Kim KS, *et al*. Design, synthesis, in-vitro antiproliferative activity and kinase profile of new picolinamide based 2-amido and ureido quinoline derivatives. *Eur J Med Chem*. 2015;101:754-68.

69. Gonzalez T, Leong SR, Presta L, G. Nucleic acids encoding humanized anti-IL-8 monoclonal antibodies. US patent 6025158. 2000.

70. Lucas BK, Giere LM, DeMarco RA, Shen A, Chisholm V, Crowley CW. High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector. *Nucleic acids research*. 1996;24(9):1774-9.

71. Buckingham J. Dictionary of natural products. 1st ed. London: Chapman & Hall; 1994.

72. Omura S, Iwai Y, Hirano A, Nakagawa A, Awaya J, Tsuchya H, *et al.* A new alkaloid AM-2282 OF Streptomyces origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. J Antibiot (Tokyo). 1977;30(4):275-82.
73. Mateos S, Slijepcevic P, MacLeod RA, Bryant PE. DNA double-strand break rejoining in xrs5 cells is more rapid in the G2 than in the G1 phase of the cell cycle. Mutat Res. 1994;315(2):181-7.
74. Yamasaki F, Hama S, Yoshioka H, Kajiware Y, Yahara K, Sugiyama K, *et al.* Staurosporine-induced apoptosis is independent of p16 and p21 and achieved via arrest at G2/M and at G1 in U251MG human glioma cell line. Cancer chemotherapy and pharmacology. 2003;51(4):271-83.
75. Abe K, Yoshida M, Usui T, Horinouchi S, Beppu T. Highly synchronous culture of fibroblasts from G2 block caused by staurosporine, a potent inhibitor of protein kinases. Experimental cell research. 1991;192(1):122-7.
76. Meijer L. Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. Trends in Cell Biology. 1996;6(10):393-7.
77. Konstantinidis AK, Radhakrishnan R, Gu F, Rao RN, Yeh WK. Purification, characterization, and kinetic mechanism of cyclin D1. CDK4, a major target for cell cycle regulation. J Biol Chem. 1998;273(41):26506-15.
78. Gadbois DM, Hamaguchi JR, Swank RA, Bradbury EM. Staurosporine is a potent inhibitor of p34cdc2 and p34cdc2-like kinases. Biochemical and biophysical research communications. 1992;184(1):80-5.

79. Gollapudi L, Neet KE. Different mechanisms for inhibition of cell proliferation via cell cycle proteins in PC12 cells by nerve growth factor and staurosporine. *Journal of neuroscience research*. 1997;49(4):461-74.
80. Harmalkar MN, Shirsat NV. Staurosporine-induced growth inhibition of glioma cells is accompanied by altered expression of cyclins, CDKs and CDK inhibitors. *Neurochemical research*. 2006;31(5):685-92.
81. Ma D, Wang P, Fang Q, Yu Z, Zhou Z, He Z, *et al*. Low-dose staurosporine selectively reverses BCR-ABL-independent IM resistance through PKC-alpha-mediated G2/M phase arrest in chronic myeloid leukaemia. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2018;46(sup3):S208-s16.
82. McGahren-Murray M, Terry NH, Keyomarsi K. The differential staurosporine-mediated G1 arrest in normal versus tumor cells is dependent on the retinoblastoma protein. *Cancer Res*. 2006;66(19):9744-53.
83. Kawauchi K, Shibutani K, Yagisawa H, Kamata H, Nakatsuji S, Anzai H, *et al*. A possible immunosuppressant, cycloprodigosin hydrochloride, obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans*. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997;237(3):543-7.
84. Jeong H, Yim JH, Lee C, Choi SH, Park YK, Yoon SH, *et al*. Genomic blueprint of *Hahella chejuensis*, a marine microbe producing an algicidal agent. *Nucleic acids research*. 2005;33(22):7066-73.

85. Song Y, Liu G, Li J, Huang H, Zhang X, Zhang H, *et al.* Cytotoxic and antibacterial angucycline- and prodigiosin-analogues from the deep-sea derived *Streptomyces* sp. SCSIO 11594. *Mar Drugs*. 2015;13(3):1304-16.
86. Williamson NR, Fineran PC, Leeper FJ, Salmond GP. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(12):887-99.
87. Songia S, Mortellaro A, Taverna S, Fornasiero C, Scheiber EA, Erba E, *et al.* Characterization of the new immunosuppressive drug undecylprodigiosin in human lymphocytes: retinoblastoma protein, cyclin-dependent kinase-2, and cyclin-dependent kinase-4 as molecular targets. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 1997;158(8):3987-95.
88. Liu P, Wang YY, Qi X, Gu Q, Geng M, Li J. Undecylprodigiosin induced apoptosis in P388 cancer cells is associated with its binding to ribosome. *PloS one*. 2013;8(6):e65381.
89. Skellam E. The biosynthesis of cytochalasans. *Nat Prod Rep*. 2017;34(11):1252-63.
90. Udagawa T, Yuan J, Panigrahy D, Chang YH, Shah J, D'Amato RJ. Cytochalasin E, an epoxide containing *Aspergillus*-derived fungal metabolite, inhibits angiogenesis and tumor growth. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;294(2):421-7.
91. Reshetnikova G, Barkan R, Popov B, Nikolsky N, Chang LS. Disruption of the actin cytoskeleton leads to inhibition of mitogen-induced cyclin E expression, Cdk2 phosphorylation, and nuclear accumulation of the retinoblastoma protein-related p107 protein. *Experimental cell research*. 2000;259(1):35-53.

92. Rubtsova SN, Kondratov RV, Kopnin PB, Chumakov PM, Kopnin BP, Vasiliev JM. Disruption of actin microfilaments by cytochalasin D leads to activation of p53. *FEBS Lett.* 1998;430(3):353-7.
93. Hayduk EJ, Lee KH. Cytochalasin D can improve heterologous protein productivity in adherent Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng.* 2005;90(3):354-64.
94. McDonald LA, Barbieri LR, Carter GT, Lenoy E, Lotvin J, Petersen PJ, *et al.* Structures of the muraymycins, novel peptidoglycan biosynthesis inhibitors. *J Am Chem Soc.* 2002;124(35):10260-1.
95. Wiegmann D, Koppermann S, Wirth M, Niro G, Leyrer K, Ducho C. Muraymycin nucleoside-peptide antibiotics: uridine-derived natural products as lead structures for the development of novel antibacterial agents. *Beilstein J Org Chem.* 2016;12:769-95.
96. Koppermann S, Cui Z, Fischer PD, Wang X, Ludwig J, Thorson JS, *et al.* Insights into the Target Interaction of Naturally Occurring Muraymycin Nucleoside Antibiotics. *ChemMedChem.* 2018;13(8):779-84.
97. Funato N, Takayanagi H, Konda Y, Toda Y, Harigaya Y, Iwai Y, *et al.* Absolute Configuration of Staurosporine By X-Ray Analysis. *Tetrahedron Letters.* 1994;35(8):1251-4.
98. Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺-dependent protein kinase. *Biochemical and biophysical research communications.* 1986;135(2):397-402.

99. Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, Gallant P, Atteridge CE, Campbell BT, *et al.* A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nature biotechnology*. 2008;26(1):127-32.
100. Albrecht S, Kaisermayer C, Gallagher C, Farrell A, Lindeberg A, Bones J. Proteomics in biomanufacturing control: Protein dynamics of CHO-K1 cells and conditioned media during apoptosis and necrosis. *Biotechnol Bioeng*. 2018;115(6):1509-20.
101. Yue TL, Wang C, Romanic AM, Kikly K, Keller P, DeWolf WE, Jr., *et al.* Staurosporine-induced apoptosis in cardiomyocytes: A potential role of caspase-3. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30(3):495-507.
102. Malsy M, Bitzinger D, Graf B, Bundscherer A. Staurosporine induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells PaTu 8988t and Panc-1 via the intrinsic signaling pathway. *Eur J Med Res*. 2019;24(1):5.
103. Heiskanen KM, Bhat MB, Wang HW, Ma J, Nieminen AL. Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells. *J Biol Chem*. 1999;274(9):5654-8.
104. Chae HJ, Kang JS, Byun JO, Han KS, Kim DU, Oh SM, *et al.* Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacol Res*. 2000;42(4):373-81.
105. Cooper CA, Gasteiger E, Packer NH. GlycoMod-a software tool for determining glycosylation compositions from mass spectrometric data. *Proteomics*. 2001;1(2):340-9.
106. UniCarbKB. <<http://www.unicarbkb.org/>> [accessed on Mar 1, 2019].
107. Masami Y. Analysis of cell-cycle-dependent production of tissue plasminogen activator analogue

(pamiteplase) by CHO cells. Biochemical Engineering Journal. 2008;39:297-304.

108. Dutton RL, Scharer J, Moo-Young M. Cell cycle phase dependent productivity of a recombinant Chinese hamster ovary cell line. Cytotechnology. 2006;52(1):55-69.

109. Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Major cell death pathways at a glance. Microbes Infect. 2009;11(13):1050-62.

110. Wagner R. 2.1 Metabolic Control of Animal Cell Culture Processes. Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production. Berlin: De Gruyter; 1997. p. 193-232.

111. Cruz HJ, Freitas CM, Alves PM, Moreira JL, Carrondo MJ. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. Enzyme Microb Technol. 2000;27(1-2):43-52.

112. Mulukutla BC, Kale J, Kalomeris T, Jacobs M, Hiller GW. Identification and control of novel growth inhibitors in fed-batch cultures of Chinese hamster ovary cells. Biotechnol Bioeng. 2017;114(8):1779-90.

113. Mulukutla BC, Mitchell J, Geoffroy P, Harrington C, Krishnan M, Kalomeris T, *et al.* Metabolic engineering of Chinese hamster ovary cells towards reduced biosynthesis and accumulation of novel growth inhibitors in fed-batch cultures. Metabolic engineering. 2019;54:54-68.

114. Gagnon M, Hiller G, Luan YT, Kittredge A, DeFelice J, Drapeau D. High-end pH-controlled delivery of glucose effectively suppresses lactate accumulation in CHO fed-batch cultures. Biotechnol Bioeng. 2011;108(6):1328-37.

115. Jeong Y-H, Wang SS. In situ removal of ammonium ions from hybridoma cell culture media: Selection of adsorbent. *Biotechnology Techniques*. 1992;6(4):341-6.
116. Cymer F, Beck H, Rohde A, Reusch D. Therapeutic monoclonal antibody N-glycosylation - Structure, function and therapeutic potential. *Biologicals*. 2018;52:1-11.
117. Satoh M, Iida S, Shitara K. Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies. *Expert opinion on biological therapy*. 2006;6(11):1161-73.
118. Davies J, Jiang L, Pan LZ, LaBarre MJ, Anderson D, Reff M. Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII. *Biotechnol Bioeng*. 2001;74(4):288-94.
119. Ferrara C, Brünker P, Suter T, Moser S, Püntener U, Umaña P. Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: influence of Golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous beta1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi alpha-mannosidase II. *Biotechnol Bioeng*. 2006;93(5):851-61.
120. Peschke B, Keller CW, Weber P, Quast I, Lünemann JD. Fc-Galactosylation of Human Immunoglobulin Gamma Isotypes Improves C1q Binding and Enhances Complement-Dependent Cytotoxicity. *Front Immunol*. 2017;8:646.
121. Chung CH, Mirakhur B, Chan E, Le QT, Berlin J, Morse M, *et al*. Cetuximab-induced anaphylaxis

and IgE specific for galactose- α -1,3-galactose. *N Engl J Med*. 2008;358(11):1109-17.

122. Liu L. Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *J Pharm Sci*. 2015;104(6):1866-84.

123. Fan Y, Jimenez Del Val I, Müller C, Wagtberg Sen J, Rasmussen SK, Kontoravdi C, *et al*. Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture affects antibody production and glycosylation. *Biotechnol Bioeng*. 2015;112(3):521-35.

124. Lee JH, Jeong YR, Kim YG, Lee GM. Understanding of decreased sialylation of Fc-fusion protein in hyperosmotic recombinant Chinese hamster ovary cell culture: N-glycosylation gene expression and N-linked glycan antennary profile. *Biotechnol Bioeng*. 2017;114(8):1721-32.

125. Borys MC, Dalal NG, Abu-Absi NR, Khattak SF, Jing Y, Xing Z, *et al*. Effects of culture conditions on N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) content of a recombinant fusion protein produced in CHO cells. *Biotechnol Bioeng*. 2010;105(6):1048-57.

126. 厚生労働省医薬食品局審査管理課. 抗体医薬品の品質評価のためのガイダンス. <<https://www.pmda.go.jp/files/000206143.pdf>> [accessed on Oct 29, 2020].

127. Kannaiyan R, Mahadevan D. A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018;18(12):1249-70.

128. Hirano S, Asamizu S, Onaka H, Shiro Y, Nagano S. Crystal structure of VioE, a key player in the construction of the molecular skeleton of violacein. *J Biol Chem*. 2008;283(10):6459-66.

129. Choi SY, Yoon KH, Lee JI, Mitchell RJ. Violacein: Properties and Production of a Versatile Bacterial Pigment. *Biomed Res Int*. 2015;2015:465056.
130. Durán M, Ponezi AN, Faljoni-Alario A, Teixeira MFS, Justo GZ, Durán N. Potential applications of violacein: a microbial pigment. *Medicinal Chemistry Research*. 2012;21(7):1524-32.
131. Kodach LL, Bos CL, Duran N, Peppelenbosch MP, Ferreira CV, Hardwick JC. Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*. 2006;27(3):508-16.
132. Mojib N, Nasti TH, Andersen DT, Attigada VR, Hoover RB, Yusuf N, *et al*. The antiproliferative function of violacein-like purple violet pigment (PVP) from an Antarctic *Janthinobacterium* sp. Ant5-2 in UV-induced 2237 fibrosarcoma. *Int J Dermatol*. 2011;50(10):1223-33.
133. Bromberg N, Dreyfuss JL, Regatieri CV, Palladino MV, Duran N, Nader HB, *et al*. Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. *Chem Biol Interact*. 2010;186(1):43-52.
134. Ferreira CV, Bos CL, Versteeg HH, Justo GZ, Duran N, Peppelenbosch MP. Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood*. 2004;104(5):1459-64.
135. Jiang PX, Wang HS, Xiao S, Fang MY, Zhang RP, He SY, *et al*. Pathway redesign for deoxyviolacein biosynthesis in *Citrobacter freundii* and characterization of this pigment. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;94(6):1521-32.

136. Wang H, Wang F, Zhu X, Yan Y, Yu X, Jiang P, *et al.* Biosynthesis and characterization of violacein, deoxyviolacein and oxyviolacein in heterologous host, and their antimicrobial activities. *Biochemical Engineering Journal*. 2012;67:148-55.
137. Bilsland E, Tavella TA, Krogh R, Stokes JE, Roberts A, Ajioka J, *et al.* Antiplasmodial and trypanocidal activity of violacein and deoxyviolacein produced from synthetic operons. *BMC Biotechnol*. 2018;18(1):22.
138. Yada S, Wang Y, Zou Y, Nagasaki K, Hosokawa K, Osaka I, *et al.* Isolation and characterization of two groups of novel marine bacteria producing violacein. *Mar Biotechnol (NY)*. 2008;10(2):128-32.
139. Momen AZ, Hoshino T. Biosynthesis of violacein: intact incorporation of the tryptophan molecule on the oxindole side, with intramolecular rearrangement of the indole ring on the 5-hydroxyindole side. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2000;64(3):539-49.
140. Haredy AM, Nishizawa A, Honda K, Ohya T, Ohtake H, Omasa T. Improved antibody production in Chinese hamster ovary cells by ATF4 overexpression. *Cytotechnology*. 2013;65(6):993-1002.
141. Mohan C, Kim Y-G, Lee GM. Apoptosis and Autophagy Cell Engineering. In: M. A-R, editor. *Cell Line Development. Cell Engineering*, vol 6. Dordrecht: Springer; 2009. p. 195-216.
142. Dahodwala H, Lee KH. The fickle CHO: a review of the causes, implications, and potential alleviation of the CHO cell line instability problem. *Curr Opin Biotechnol*. 2019;60:128-37.

143. Chusainow J, Yang YS, Yeo JH, Toh PC, Asvadi P, Wong NS, *et al.* A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: what makes a stable high producer? *Biotechnol Bioeng.* 2009;102(4):1182-96.
144. Feichtinger J, Hernandez I, Fischer C, Hanscho M, Auer N, Hackl M, *et al.* Comprehensive genome and epigenome characterization of CHO cells in response to evolutionary pressures and over time. *Biotechnol Bioeng.* 2016;113(10):2241-53.
145. Queiroz KC, Milani R, Ruela-de-Sousa RR, Fuhler GM, Justo GZ, Zambuzzi WF, *et al.* Violacein induces death of resistant leukaemia cells via kinome reprogramming, endoplasmic reticulum stress and Golgi apparatus collapse. *PloS one.* 2012;7(10):e45362.
146. Pugazhenth S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, Heasley LE, *et al.* Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem.* 2000;275(15):10761-6.
147. Lonze BE, Riccio A, Cohen S, Ginty DD. Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron.* 2002;34(3):371-85.
148. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007;129(7):1261-74.
149. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, *et al.* Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science.* 1998;282(5392):1318-21.

150. Jin M, Szapiel N, Zhang J, Hickey J, Ghose S. Profiling of host cell proteins by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE): Implications for downstream process development. *Biotechnol Bioeng.* 2010;105(2):306-16.
151. Hossler P, Wang M, McDermott S, Racicot C, Chemfe K, Zhang Y, *et al.* Cell culture media supplementation of bioflavonoids for the targeted reduction of acidic species charge variants on recombinant therapeutic proteins. *Biotechnol Prog.* 2015;31(4):1039-52.
152. Ōmura S, Asami Y, Crump A. Staurosporine: new lease of life for parent compound of today's novel and highly successful anti-cancer drugs. *J Antibiot (Tokyo).* 2018;71(8):688-701.
153. Levis M. Midostaurin approved for FLT3-mutated AML. *Blood.* 2017;129(26):3403-6.
154. Akinaga S, Sugiyama K, Akiyama T. UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) and other indolocarbazole compounds: a new generation of anti-cancer agents for the new century? *Anticancer Drug Des.* 2000;15(1):43-52.
155. Du Z, McCarter JD, Reddy P, Snowden AW, McGee LR, Allen JG, *et al.*, inventors Methods of using cell-cycle inhibitors to modulate one or more properties of a cell culture patent Patent US20140199728/WO2014109858. 2014.
156. 日本 PDA 製薬学会 バイオウイルス委員会 (編). バイオ医薬品ハンドブック 第 3 版 *Biologics の製造から品質管理まで*. 東京: 株式会社じほう; 2018.

関連論文

1. Kido M, Idogaki H, Nishikawa K, Motoishi K, Omasa T. Screening of new cell cycle suppressive compounds from marine-derived microorganisms in Chinese hamster ovary cells. *J Biosci Bioeng.* 2020;130 (1):106-113. <https://doi:10.1016/j.jbiosc.2020.03.001>.
2. Kido M, Idogaki H, Nishikawa K, Omasa T. Low-concentration staurosporine improves recombinant antibody productivity in Chinese hamster ovary cells without inducing cell death. *J Biosci Bioeng.* 2020;130 (5):525-532. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.07.005>.
3. Kido M, Idogaki H, Nishikawa K, Omasa T. Violacein improves recombinant IgG production by controlling the cell cycle of Chinese hamster ovary cells. *Cytotechnology.* 2020. <https://doi.org/10.1007/s10616-020-00434-3>. “In press”

謝辞

本研究をまとめるにあたり、御指導、御助力を賜りました大阪大学 大政健史教授に深く感謝いたします。学位論文審査をしていただいた大阪大学 村中俊哉教授、内山進教授、本田孝祐教授に深く感謝いたします。研究遂行にあたり様々な御助力、ご意見、また雑誌会等にて本研究への多くのヒントを与えて下さりました古賀先生、山野先生ならびに大政研究室の皆様に深く感謝いたします。ヴィオラセイン産生菌を分譲して頂き、また培養方法等さまざまなアドバイスを頂きました高知工科大学 榎本教授に深く感謝いたします。また本研究実施にて多大なご協力を頂いた次世代バイオ医薬品製造技術研究組合および神戸 GMP 集中研の皆様に深く感謝いたします。海洋由来微生物からの成分単離、同定についてご協力いただいたオーピーバイオフクトリー (株) 藤原氏に厚く御礼申し上げます。また、本研究を行なうにあたりご協力頂いた、(株) 大阪ソーダ 井戸垣秀聡氏、西川孝二氏、本石加奈氏に厚く御礼申し上げます。最後に、私がこの研究を完遂できたのは私の妻と娘達の理解と支えによるものであり、ここに特別な感謝の意を表します。