



Title	Production and quality of recombinant IgA1 produced in disaccharide-adapted CHO-K1 cells
Author(s)	Choa, John Benson Dy
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/92928
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (JOHN BENSON DY CHOA)	
Title	Production and quality of recombinant IgA1 produced in disaccharide-adapted CHO-K1 cells (二糖含有培地に馴化したCHO-K1細胞における遺伝子組換えIgA1の生産と品質)
Abstract of Thesis Chapter 1: General Introduction In recent years, the potential of immunoglobulin A (IgA) as a therapeutic antibody has been demonstrated. However, low production yield has been detrimental for its application. Medium supplementation is one of the simplest and most effective approaches in improving productivity and quality of recombinant proteins. Some disaccharides have been used to improve productivity in recombinant protein production. However, high concentrations of disaccharides have been known to cause hyperosmotic stress. Thus, in this study, IgA1-producing CHO-K1 suspension cells were adapted to a high concentration (150 mM) of different disaccharides to improve the production and quality of recombinant IgA1. Chapter 2: Production of recombinant IgA1 in disaccharide-adapted CHO-K1 cells Stably IgA1 producing CHO-K1 suspension cell lines were adapted to 150 mM of different disaccharides (sucrose, maltose, lactose, and trehalose). Viable cell count, cell viability, glucose consumption, lactate production, and recombinant IgA1 (rIgA1) concentration and specific productivity were analyzed in this study. The disaccharide-adapted cell lines grew at a slower rate but exhibited longer cell viability. Maltose-adapted cell lines contained glucose even at 9th day of culture while other cell lines consumed the glucose completely. Disaccharide-adapted cell lines produced more lactate compared to nonadapted cell line. All the disaccharide-adapted cell line produced more rIgA1 compared to the nonadapted cell line. The maltose-adapted cell line had a 4.5-fold increase in specific productivity compared to the nonadapted line which was highest productivity achieved in IgA with lambda light chain. Chapter 3: Quality of recombinant IgA1 in disaccharide-adapted CHO-K1 cells Quality characteristics, such as the formation of high molecular weight (HMW) aggregates and the glycosylation patterns of recombinant proteins, are critical in evaluating the efficacy and safety of the biopharmaceuticals being generated. Unexpected formation of HMW aggregates of recombinant IgA1 was detected in all cell lines. However, more HMW aggregates were found in disaccharide-adapted cell lines. This HMW aggregates formation might be caused by the increase in productivity thereby forming self-aggregates. N-glycan profile of all the cell lines contained mostly high-mannosylated structures. O-glycan profile of rIgA1 produced by nonadapted cell line contained GalGalNAc structures which was not found in disaccharide-adapted cell lines. In addition, O-glycan found in disaccharide adapted cell lines are mostly SiaGalGalNAc and Sia2GalGalNAc structures. This high sialylation might be the cause of increased expression of ST3Gal transferases caused by hyperosmotic condition. In addition, MGAT1 gene expression was unchanged among the all the cell lines, therefore, the N-glycan profile are the same. Chapter 4: General Conclusions and perspectives Disaccharide-adaptation of CHO-K1 cell lines increased the specific productivity of recombinant IgA1 produced under hyperosmotic stress. In addition, maltose-adapted cell line has a more pronounced increase in productivity with maltose being utilized by the cell as an additional carbohydrate source. Hyperosmotic conditions did not affect the N-glycan of IgA1. However, it affected the O-glycan profile of IgA1 by increasing the gene expression of ST3Gal transferases enzymes.	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (JOHN BENSON DY CHOA)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	藤山 和仁
	副 査	教授	内山 進
	副 査	教授	大政 健史

論文審査の結果の要旨

現在、免疫グロブリン（Ig）Gが主品目として巨大なバイオ医薬品市場を生み出している。一方で、粘膜等に豊富に存在し有用性が指摘されているIgAについては遺伝子組換え生産量が低く、安定供給に向けた高生産条件の検討や機能性に関わる翻訳後修飾についての知見の集積が必要である。本論文では、IgAを遺伝子組換え生産するチャイニーズハムスター卵巢（CHO）細胞を構築し、さらに無血清培地への馴化に成功している。次に、当該細胞を培養液に種々の二糖を添加することで高浸透圧下におき、さらに二糖添加培地に馴化することで既存の報告を上回るIgA比生産速度を達成している。また、タンパク質の機能に影響を与える翻訳後修飾糖鎖付加に着目し、浸透圧がCHO細胞で生産したN-結合型糖鎖構造にはほとんど影響を与えないがO-結合型糖鎖構造の分布を変化させることを見出している。

第一章では、本研究を着想するに至った経緯および目的について記述している。IgA（特にIgA1）のバイオ医薬品としての可能性を示すとともに、現状でほとんど工業生産に至っていない理由を述べている。この問題を解決するため、IgGの生産性向上で実績のある抗体生産細胞への浸透圧増加に着目している。浸透圧を与えるための簡便かつ経済的な方法として、安価で大量供給が可能な二糖類を培養液中に添加する方法を採用している。一方、一過的な浸透圧増加は細胞増殖効率の低下を招くため、細胞を二糖添加培地に馴化しIgA1の生産と品質を向上することを目的としている。

第二章では、IgA1を安定的に生産できるCHO-K1浮遊細胞の構築と当該細胞の二糖添加培地への馴化に成功している。IgA1生産CHO-K1細胞を150 mMの異なる二糖（スクロース、マルトース、ラクトース、トレハロース）添加培地にそれぞれ馴化したところ、これらの細胞では非添加培地で培養したコントロール細胞と比較して、増殖速度が遅いものの細胞生存率が高くなること、より多くの乳酸を生成すること、さらにIgA1生産性が向上すること（特にマルトース馴化細胞ではコントロールと比較して4.5倍増加）を明らかにしている。

第三章では、第二章で生産したIgA1の品質を分析している。馴化細胞で生産したIgA1はコントロールより高い凝集性を示し、原因は生産性の向上による自己凝集体形成に起因する可能性を指摘している。また、IgA1のN-結合型糖鎖構造の分布は馴化、非馴化に関わらず約90%が高マンノース型構造であるが、馴化下ではO-結合型糖鎖はほとんどがシアリル化構造であり、非馴化下で検出したGalGalNAc構造を含まないことを発見している。馴化下で見られるO-結合型糖鎖の高シアリル化はST3Gal転移酵素の発現が増加することが原因であることを指摘している。

第四章では、二糖がもたらす浸透圧ストレスが遺伝子組換えIgA1の生産と品質に与える効果を示した本論文内容を総括するとともに、成果が今後の工業的IgA生産システムの樹立に有益な知見となる可能性について言及している。

本論文では、有用バイオ医薬品としての可能性をもつIgAの低生産性を安価な二糖がもたらす浸透圧ストレスを利用して改善し、生成されるバイオ医薬品の有効性と安全性を評価する上で重要な凝集体の形成や糖鎖構造などの品質特性に与える効果明らかにしている。これらの成果は、バイオ医薬品を高生産できるシステムの構築に十分有益な知見を与えると考える。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。