

博士学位論文

低分子化合物による **CHO** 細胞の  
抗体生産能力向上に関する研究

秋田大学 大学院理工学研究科 博士後期課程

総合理工学専攻 生命科学領域

安藝 祐一

2022



## 目次

1.	序章 .....	1
2.	rCHO 細胞培養における mAb 生産性を向上させる低分子化合物の選定 .....	12
2.1	96 ウェルプレートとフラスコを用いたスクリーニングによる低分子化合物の選定 .....	13
2.1.1	96 ウェルプレートを用いた評価系の構築 .....	13
2.1.2	96 ウェルプレートを用いた 1 次スクリーニング .....	16
2.1.3	50 mL 浮遊培養フラスコを用いた 2 次スクリーニング .....	18
2.1.4	2 次スクリーニング結果の再現性確認ならびに化合物の選定 .....	20
2.2	2 次スクリーニング時の高評価化合物の化学構造 .....	22
2.3	考察 .....	23
2.4	小括 .....	26
3.	MPPB の特性解析と培養への影響評価 .....	27
3.1	バッチ培養による MPPB の特性解析 .....	28
3.1.1	rCHO 細胞培養時の MPPB の適正濃度 .....	28
3.1.2	rCHO 細胞の代謝への MPPB の濃度依存性 .....	29
3.1.3	MPPB の細胞周期への影響 .....	30
3.2	MPPB 共存下でのバッチ培養ならびにフェドバッチ培養における長期培養 .....	31
3.2.1	MPPB 共存下でのバッチ培養における長期培養の結果 .....	31
3.2.2	MPPB 共存下でのフェドバッチ培養における長期培養の結果 .....	34
3.2.3	MPPB の N 型糖鎖への影響評価 .....	37
3.3	バッチ培養における MPPB の添加方法の検討 .....	38
3.4	考察 .....	40
3.5	小括 .....	46
4.	MPPB の構造活性相関と培養による活性部位の評価 .....	47
4.1	MPPB の活性部位の探索と活性部位の構造活性相関 .....	47
4.2	2,5-DP の rCHO 細胞培養への影響評価 .....	53
4.2.1	2,5-DP 共存下でのバッチ培養における長期培養の結果 .....	53
4.2.2	2,5-DP 共存下でのフェドバッチ培養における長期培養の結果 .....	56
4.3	考察 .....	58
4.4	小括 .....	61
5.	MPPB ならびに 2,5-DP の作用の一般性 .....	62
5.1	MPPB ならびに 2,5-DP の作用の一般性の確認 .....	63
5.1.1	rCHO 細胞培養時の MPPB の適正濃度 .....	64
5.1.2	rCHO 細胞培養時の 2,5-DP の適正濃度 .....	66
5.1.3	MPPB ならびに 2,5-DP による細胞周期への影響 .....	68
5.1.4	MPPB ならびに 2,5-DP による細胞内 ATP 濃度への影響 .....	69

5.2	MPPB ならびに 2,5-DP のフェドバッチ培養における作用の一般性の評価.....	71
5.3	バッチ培養での MPPB ならびに 2,5-DP の塩化リチウムとの比較.....	73
5.4	考察.....	75
5.5	小括.....	79
6.	結論.....	80
7.	実験の部.....	82
7.1	抗体生産株と細胞培養用培地.....	82
7.2	低分子化合物ライブラリ.....	82
7.3	拡大培養条件.....	82
7.4	1 次スクリーニング方法.....	83
7.5	2 次スクリーニング方法.....	83
7.6	化合物の最終選定.....	83
7.7	バッチ培養による MPPB の各種特性解析の条件.....	84
7.8	フェドバッチ培養による評価条件.....	84
7.9	バッチ培養による MPPB 添加方法の検討条件.....	84
7.10	生細胞細胞密度と細胞生存率の測定.....	84
7.11	代謝物の測定.....	85
7.12	mAb の濃度測定.....	85
7.13	細胞内 ATP 濃度の測定.....	85
7.14	各種単位細胞あたりの数値の算出.....	85
7.15	N 型糖鎖の分析.....	86
7.16	統計解析.....	86
8.	引用文献.....	87
9.	謝辞.....	100
Figure 1	1%DMSO 濃度下での rCHO 細胞培養の挙動 <sup>15)</sup> .....	2
Figure 2	10 mM 塩化リチウム濃度下における rCHO 細胞培養の挙動 <sup>16)</sup> .....	2
Figure 3	5mM の酪酸を用いた細胞株毎の mAb 発現量の比較 <sup>17)</sup> .....	3
Figure 4	10-100 $\mu$ M のカテキン濃度下における rCHO 細胞培養の挙動 <sup>20)</sup> .....	4
Figure 5	ヒポキサンチン 10 mg/L, チミジン 2 mg/L 濃度下における rCHO 細胞培養の挙動 <sup>22)</sup> .....	5
Figure 6	CCI 添加時の rCHO 細胞培養の挙動 <sup>23)</sup> .....	6
Figure 7	3-MA 添加時の rCHO 細胞培養の挙動 <sup>24)</sup> .....	7
Figure 8	化合物 7312 添加時の rCHO 細胞培養の挙動 <sup>25)</sup> .....	8
Figure 9	動物細胞培養液に添加することで生産性を向上させることが知られている化合物の例.....	9
Figure 10	96 ウェルプレートを用いた低分子化合物群の1次スクリーニング結果.....	16
Figure 11	50 mL 浮遊培養フラスコを用いた 2 次スクリーニング結果.....	18

Figure 12	2 次スクリーニングで得られた 4 化合物の再現性の評価	20
Figure 13	再現性を評価した 4 化合物の化学構造	20
Figure 14	2 次スクリーニング時の高評価化合物の化学構造	22
Figure 15	rCHO 細胞の MPPB 濃度依存性	28
Figure 16	細胞内 ATP 量と単位細胞あたりのグルコース消費速度	29
Figure 17	MPPB の添加による rCHO 細胞の細胞周期の変化	30
Figure 18	MPPB 共存下バッチ培養における長期培養の評価 (1/2)	31
Figure 19	MPPB 共存下バッチ培養における長期培養の評価 (2/2)	32
Figure 20	MPPB 共存下フェドバッチ培養における長期培養の評価 (1/2)	35
Figure 21	MPPB 共存下フェドバッチ培養における長期培養の評価 (2/2)	36
Figure 22	MPPB の N 型糖鎖への影響	37
Figure 23	MPPB 添加方法の検討結果	39
Figure 24	活性部位を調査するために用いた MPPB の部分構造	48
Figure 25	MPPB の部分構造による CSPR への影響	48
Figure 26	2,5-DP の活性構造相関評価に用いたアルキルピロール誘導体	49
Figure 27	アルキルピロール誘導体の rCHO 細胞への影響評価	51
Figure 28	2,5-DP 共存下バッチ培養における長期培養の評価 (1/2)	53
Figure 29	2,5-DP のバッチ培養における代謝プロファイル	54
Figure 30	2,5-DP 共存下フェドバッチ培養における長期培養の評価 (1/2)	56
Figure 31	2,5-DP 共存下フェドバッチ培養における長期培養の評価 (2/2)	57
Figure 32	rCHO-2 と rCHO-F への MPPB の最適添加濃度の評価	64
Figure 33	rCHO-2 と rCHO-F への 2,5-DP の最適添加濃度の評価	66
Figure 34	MPPB ならびに 2,5-DP による細胞周期への影響評価	68
Figure 35	MPPB ならびに 2,5-DP による細胞内 ATP 濃度への影響評価	69
Figure 36	フェドバッチ条件下における MPPB の rCHO-2 と rCHO-F への影響評価	71
Figure 37	フェドバッチ条件下における 2,5-DP の rCHO-2 と rCHO-F への影響評価	72
Figure 38	バッチ培養における塩化リチウムと MPPB および 2,5-DP の特性比較	73
Table 1	CCI 添加時の rCHO 細胞の細胞周期 <sup>23)</sup>	6
Table 2	96 ウェルプレートを用いたスクリーニング系の均一性評価	13
Table 3	4-PBA を用いた評価系の挙動確認	14
Table 4	MPPB の添加プロトコル	38
Table 5	2,5-DP の構造活性相関	50

## 略号

本論文では以下の略語及び記号を用いた。

2-AB	2-Aminobenzamide
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
4-PBA	4-Phenylbutyric acid
ATP	Adenosine triphosphate
BINDS	Basis for Supporting Innovative Drug Discovery and Life Science Research
CCI	Cell cycle inhibitor
CDC	Complement-dependent cellular cytotoxicity
CDK	Cyclin-dependent kinase
CSPR	Cell-specific production rate
CV	Coefficient of variation
2,5-DP	2,5-Dimethylpyrrole
DMSO	Dimethyl sulfoxide
HTS	High Throughput Screening
IgG	Immunoglobulin G
IVCC	Integral viable cell concentration
3-MA	3-Methyl adenine
mAb	Monoclonal antibody
MPPB	4-(2,5-Dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl)- <i>N</i> -(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) benzamide
qP	Specific productivity
rCHO	Recombinant Chinese hamster ovary
ROS	Reactive oxygen species
S/B	Signal background ratio
SD	Standard deviation

TCA

Tricarboxylic acid cycle

## 1. 序章

この数十年でバイオ医薬品を用いた病気の治療法は汎用化され、低分子医薬品による治療が主流であった病気に対してバイオ医薬品が適応されるケースが見られるようになってきている。中でも低分子医薬品よりも標的選択的に作用する mAb は、正常細胞を傷つけ難いため、がん<sup>1)</sup>や自己免疫疾患<sup>2)</sup>の治療法として注目を集めており、抗がん剤として Pembrolizumab<sup>3)</sup>、Nivolumab<sup>4)</sup>、Trastuzumab<sup>5)</sup>、自己免疫疾患の治療薬として Adalimumab<sup>6)</sup>、Infliximab<sup>7)</sup>などの mAb が既に実用化されている。また、mAb が汎用化されるにつれ、益々増産が求められると共に低コスト化が求められてきている。一般的に mAb は目的の mAb 遺伝子を含む rCHO 細胞により生産されており、生産性は従来リッターあたり数十ミリグラムであったが、アカデミアや製薬企業による効果的なベクターシステム<sup>8,9)</sup>の開発、宿主や培地の改良<sup>10-12)</sup>、培養プロセスの最適化<sup>13,14)</sup>により、昨今では数グラムレベルの生産性にまで高められている。しかし、rCHO 細胞の様な動物細胞を用いた医薬品製造の場合、動物細胞の物理的なストレスへの耐性或細胞内の複雑さなど様々な理由により、低分子医薬品ほど人為的な生産性の制御は難しいため、その製造費用はいまだ高額である。そこで本研究では、医療費抑制などの社会貢献や企業の持続可能な成長のために、更なる生産性の向上に向けて研究を実施する方針とした。rCHO 細胞を用いた目的タンパク質の生産性向上は主に前述の手法で実施されているが、低分子化合物を培養中の rCHO 細胞に添加する手法を報告している例は限られている。

例えば、Liu らは、rCHO 細胞を用いて遺伝子組み換えマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) を生産するにあたり、1%濃度の DMSO が細胞周期を G0/G1 に偏らせると共に細胞増殖を抑制し、目的タンパク質の濃度を向上させると報告している (Figure 1)<sup>15)</sup>。また、Ha らは、10 mM の塩化リチウム<sup>16)</sup>濃度下で rCHO 細胞を培養することで細胞周期が G2/M に偏ると共に細胞増殖が抑制され、Fc-fusion タンパク質の濃度が向上すると報告している (Figure 2)。



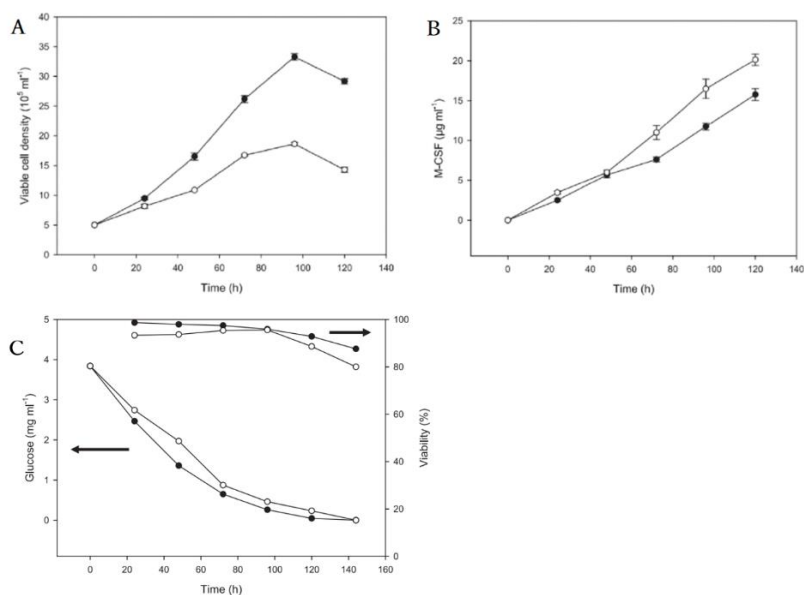


Figure 1 1%DMSO 濃度下での rCHO 細胞培養の挙動<sup>15)</sup>

A: 生細胞数濃度の変化、B: M-CSF の濃度変化、C: グルコース濃度と細胞生存率の変化。●:

DMSO(-)、○: DMSO(+)

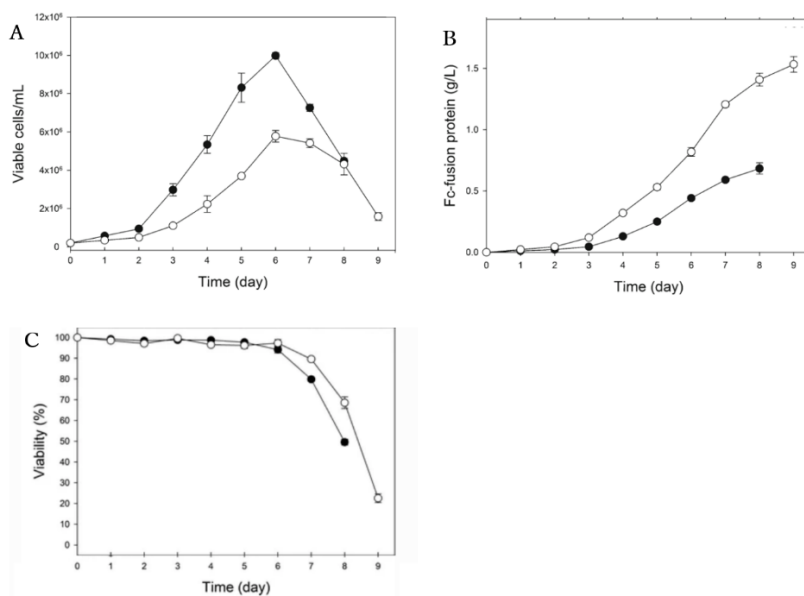


Figure 2 10 mM 塩化リチウム濃度下における rCHO 細胞培養の挙動<sup>16)</sup>

A: 生細胞密度の変化、B: Fc-fusion タンパク質の濃度変化、C: 細胞生存率の変化

●: 塩化リチウム(-)、○: 塩化リチウム(+)

Jiang らは、遺伝子転写の制御因子であるヒストン脱アセチル化酵素を阻害する酪酸が、遺伝子の転写レベルを向上させることで rCHO 細胞からの mAb 生産性が向上する例を報告している (Figure 3)<sup>17)</sup>。彼らは、8 種の rCHO 細胞株に対して 5 mM の濃度で酪酸を加え、単位細胞あたりの mAb の発現量 (qP) ならびに最終的な mAb 濃度の増減の挙動が rCHO 細胞株毎に異なる挙動を示したことを報告している。なお、酪酸の添加による細胞周期への影響は記述されていないが、彼らの研究においても細胞増殖は化合物添加により抑制されている。また、Park らと Yang らにより、酪酸と化学構造が近い吉草酸<sup>18)</sup>、バルプロ酸<sup>19)</sup>も酪酸と同様に rCHO 細胞の増殖性を抑制し mAb の生産濃度を向上させることが報告されている。なお、吉草酸は rCHO 細胞の細胞周期を G1/S フェーズに偏らせると報告されている。

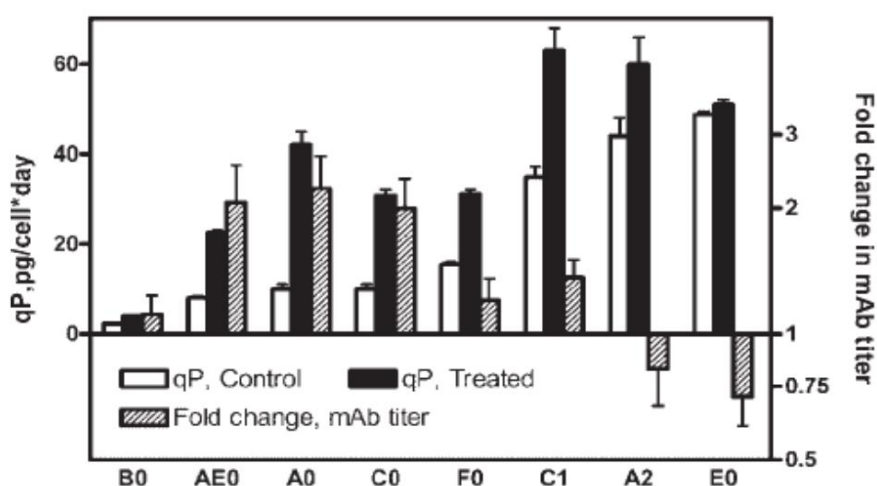


Figure 3 5mM の酪酸を用いた細胞株毎の mAb 発現量の比較<sup>17)</sup>

白抜き:酪酸(-)の CSPR、黒塗り:酪酸(+ )の CSPR、斜線:酪酸(-)時の mAb 濃度に対する酪酸(+ )時の mAb 濃度の比

また、Urquiza らは、フェノール系酸化防止剤<sup>20)</sup>が CSPR を向上させると報告しており、例えばカテキンは 25-100  $\mu\text{L}$  の濃度で細胞増殖を抑制すると共に単位細胞当たりの mAb 生産性を向上させる。Urquiza らはカテキンによる細胞周期の変化については報告していないが、Yamano らによりカ

テキニの誘導体である(-)-エピガロカテキンガラート<sup>21)</sup>が rCHO 細胞の細胞周期を G0/G1 フェーズに偏らせることが報告されていることから、カテキンも細胞周期を G0/G1 フェーズに偏らせていると推測される (Figure 4)。

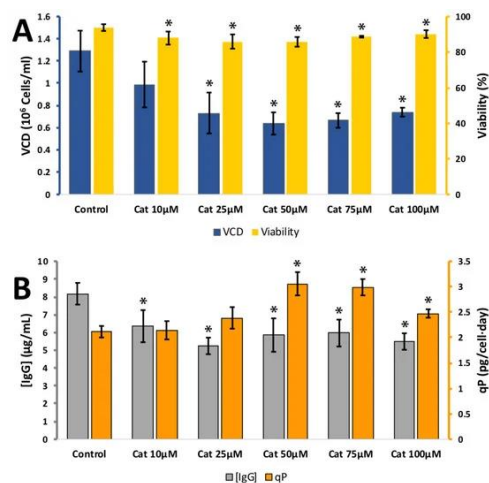


Figure 4 10-100 μM のカテキン濃度下における rCHO 細胞培養の挙動<sup>20)</sup>

A: カテキン濃度毎の生細胞密度 (青色) と細胞生存率 (黄色)、B: カテキン濃度毎の mAb (IgG) の濃度 (灰色) と CSPR (橙色)

なお、核酸を用いた生産性向上の例も報告されている。Chen らは、ヒポキサンチンとチミジン<sup>22)</sup>が各々 10 mg/L, 2 mg/L となる濃度下で rCHO 細胞を培養すると、培養初期の細胞増殖が増加して培養期間を通じた総細胞数が多くなるため、培養終了日の mAb 濃度が高くなると報告している。この例では、先述した化合物群とは異なり、化合物の添加による CSPR の上昇は生じない (Figure 5)。

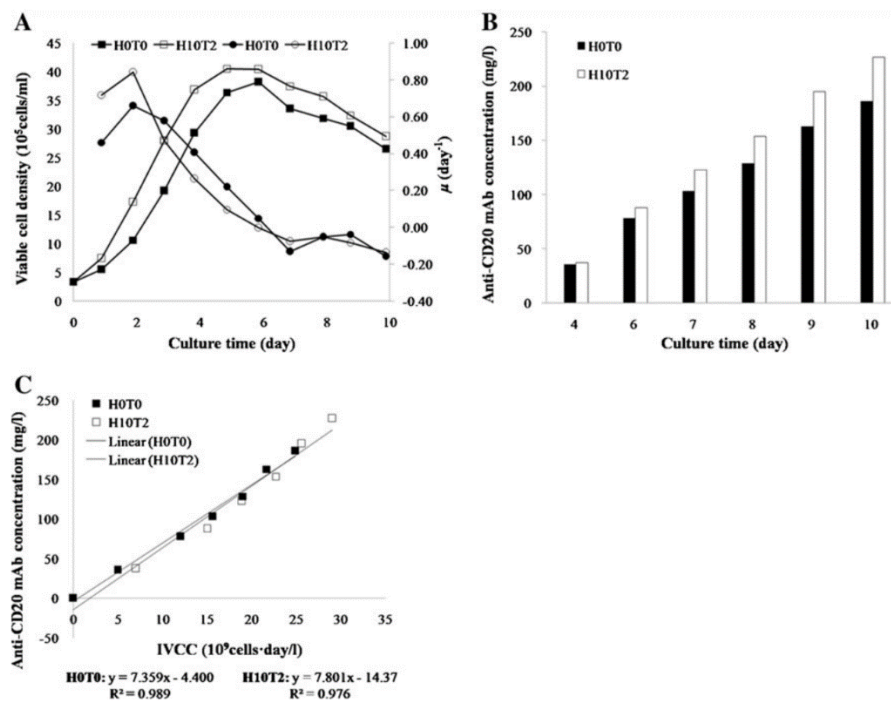


Figure 5 ヒポキサンチン 10 mg/L, チミジン 2 mg/L 濃度下における rCHO 細胞培養の挙動<sup>22)</sup>

A: 生細胞密度(■、□)と細胞増殖率(●、○)の変化、B: mAb の濃度変化、C: IVCC に対する mAb 濃度の変化(傾き: CSPR)。ヒポキサンチンとチミジン各々 10 mg/L と 2 mg/L 添加(黒枠)、ヒポキサンチンとチミジン無添加(白枠)。

更に、CCI である CDK4 / 6 阻害剤<sup>23)</sup>は、細胞周期を制御している G1 チェックポイントを阻害して rCHO 細胞の 73-96% の細胞周期を G0/G1 フェーズに固定することが Du らにより報告された。この手法では mAb の CSPR が 2 倍程度増加した(Figure 6, Table 1)。

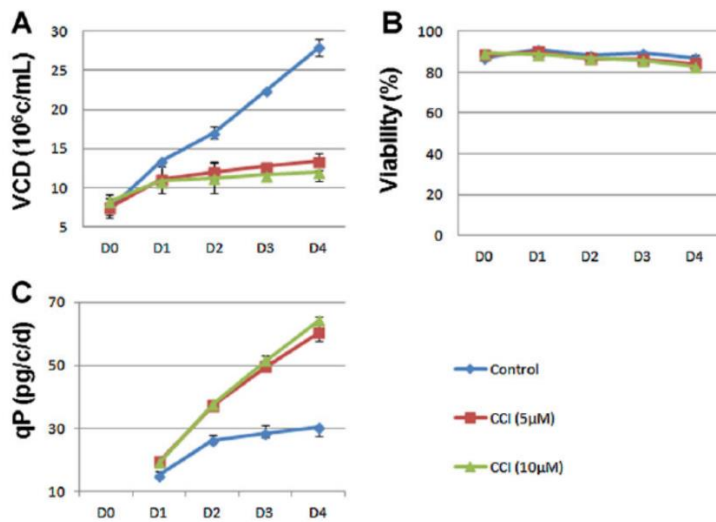


Figure 6 CCI 添加時の rCHO 細胞培養の挙動<sup>23)</sup>

A: 生細胞密度、B: 細胞生存率、C: CSPR。CCI 非添加(◇)、5 μM CCI(□)、10 μM CCI(△)。

Table 1 CCI 添加時の rCHO 細胞の細胞周期<sup>23)</sup>

	Days post treatment	Cell Cycle Distribution (%)		
		G1 Mean (SD)	S Mean (SD)	G2/M Mean (SD)
Mock	1	49.8 (1.8)	41.3 (1.1)	7.9 (0.3)
	2	56.6 (2.1)	40.7 (1.1)	2.7 (2.5)
	3	55.3 (3.2)	38.6 (2.1)	6.1 (1.1)
	4	62.1 (1.3)	30.6 (1.3)	7.3 (0.9)
CCI	1	95.7 (1.5)	2.6 (0.3)	1.8 (0.3)
	2	96.7 (1.3)	2.1 (0.4)	1.2 (0.6)
	3	93.5 (2.1)	4.8 (0.7)	1.6 (0.3)
	4	94.8 (2.4)	5 (1.1)	0.3 (0.1)

Mock: CCI 非添加、CCI: CCI 添加。括弧内は標準偏差。

小胞体ストレス応答経路を活性化させることで rCHO 細胞の CSPR を向上させる例としては、Baek らにより 3-メチルアデニン<sup>24)</sup>が報告されている。この化合物を rCHO 細胞に作用させることで

Atf4 や Ddit3 などのアポトーシス関連遺伝子が誘導され生細胞率が低下する一方で、目的とする Fc 融合タンパク質の CSPR が向上する。また、同時に細胞増殖も抑制されると報告されている (Figure 7)。

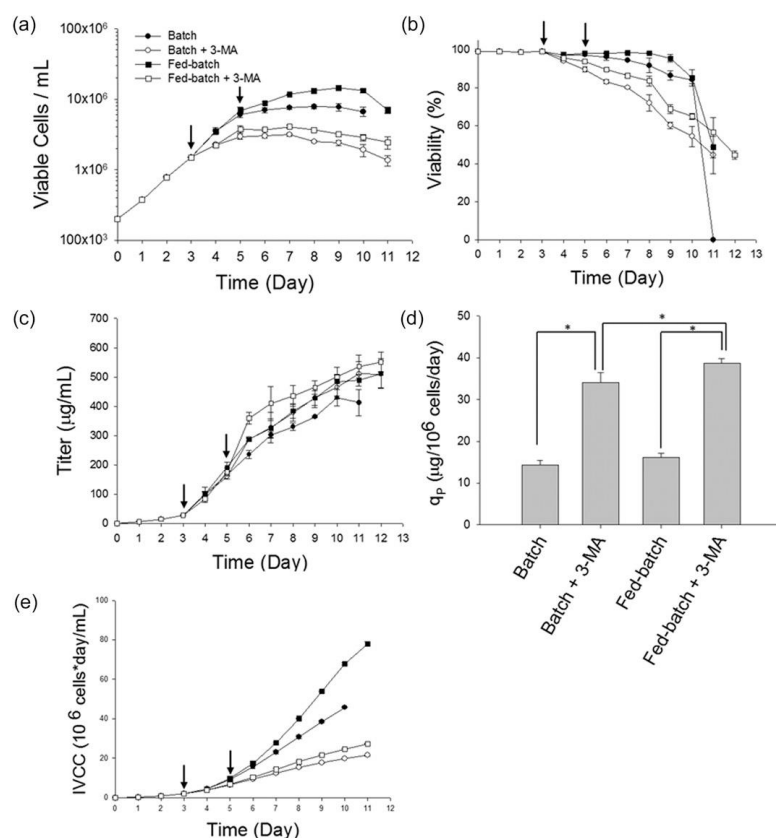


Figure 7 3-MA 添加時の rCHO 細胞培養の挙動<sup>24)</sup>

(a): 生細胞密度の変化、(b): 生細胞率の変化、(c): 目的タンパク質発現濃度の変化、(d): CSPR、  
(e): 積算細胞数の変化

3-MA 非添加(黒)、3-MA 添加(白)、Batch(丸)、Fed-batch(四角)

最後に示す例として、Arden らは、カスパーゼ阻害剤として作用する化合物 7312<sup>25)</sup>が rCHO 細胞のアポトーシスを抑制することで mAb の生産性を改善することを報告している。なお、化合物 7312 は Idun pharmaceuticals 社の開発化合物であり構造は非開示となっている (Figure 8)。

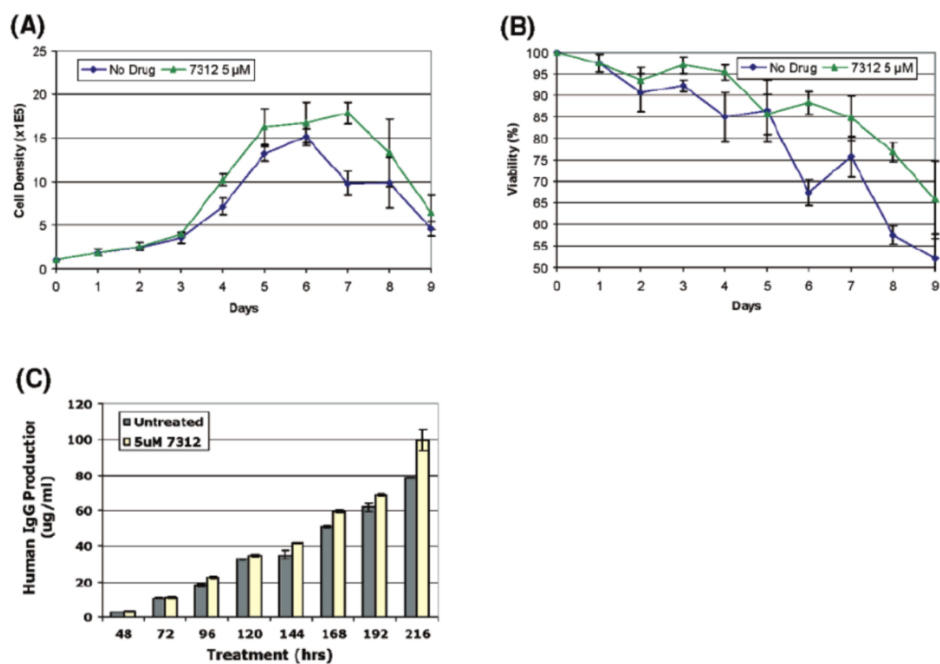


Figure 8 化合物 7312 添加時の rCHO 細胞培養の挙動<sup>25)</sup>

(A): 生細胞密度の変化、(B): 細胞生存率の変化、(C): 目的タンパク質発現濃度の変化

以上が過去 10 年以内に報告されてきた rCHO 細胞からの目的タンパク質の生産性を向上させる低分子化合物の例である (Figure 9)。概観すると、細胞増殖を抑制すると共に CSPR を増加させて全体の生産性を向上させる特性を有する化合物が多い一方で、ヒポキサンチンとチミジンのように CSPR を変えずに到達細胞密度を増加させて全体の生産性を向上させる化合物や、化合物 7312 のようにアポトーシスを抑制して細胞生存率を維持することで全体の生産性を向上させる化合物があり、作用毎に大まかに分類可能である。なお、報告されている化合物群を化学構造で分類すると、30%は飽和脂肪酸 (吉草酸、バルプロ酸、酪酸) であり、他の 30%はピリミジン誘導体 (ヒポキサンチンとチミジン、Cell cycle inhibitor、3-MA) である。生産性に影響する既存の化合物構造にはある程度の共通性がみられる。

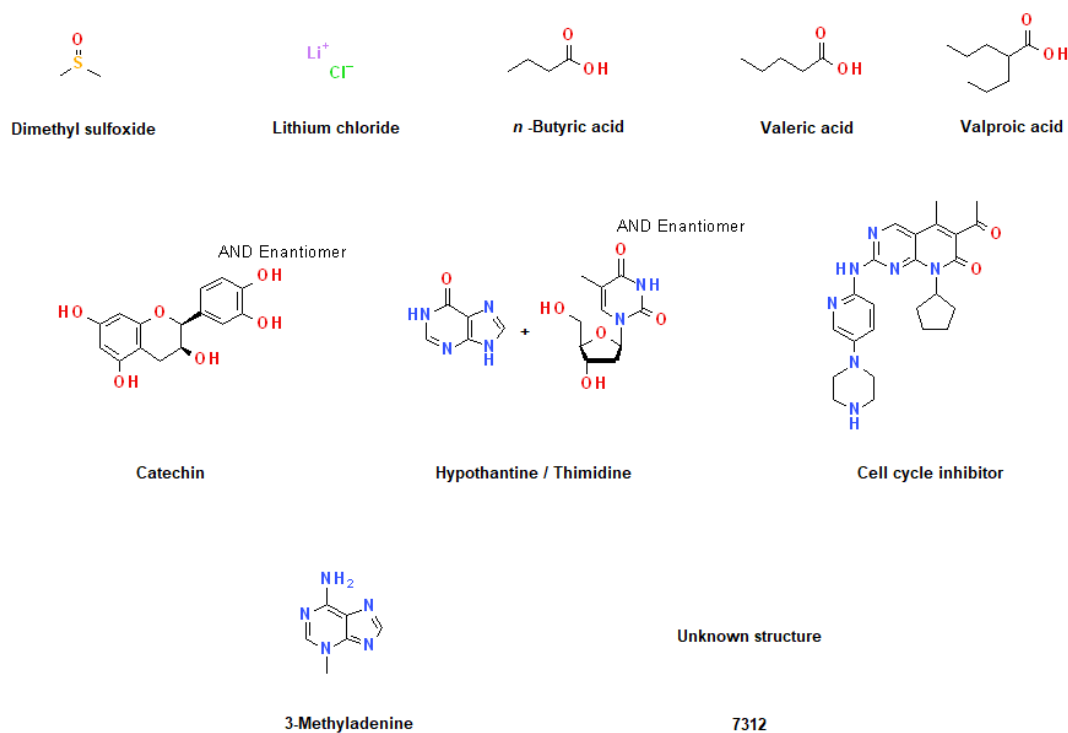


Figure 9 動物細胞培養液に添加することで生産性を向上させることが知られている化合物の例

しかし、低分子化合物は世の中に数多く存在し、生物活性の有無が未解明の化合物も多いことから本研究では、rCHO 細胞による mAb 生産性を向上させる新規低分子化合物を見出すことを目的とし探索研究を実施した。

大規模化合物ライブラリを対象とした一連の探索研究の結果、rCHO 細胞の増殖を抑制すると共に単位細胞あたりのグルコースの消費量を増加させ、細胞内 ATP 濃度と単位細胞あたりの mAb の生産性を向上させる低分子化合物 MPPB を見出した。なお、MPPB は特定の条件において全体の最終的な mAb 濃度も上昇させることから、mAb 生産性を向上させる実用的な添加剤になる可能性がある。また、MPPB は rCHO 細胞の細胞周期を G2/M に偏らせると共に mAb の糖鎖のガラクトシル化を低減すると分かった。



続いて、MPPB の化学構造の最適化による mAb 生産性の更なる向上を目指して MPPB の活性中心を調査した結果、2,5-DP 部位が活性中心であることが分かった。2,5-DP を添加剤として用いると、MPPB 以上に rCHO 細胞の増殖を抑制し単位細胞あたりの mAb 生産性を向上させた。更に 2,5-DP 類縁体による rCHO 細胞への影響を評価した結果、ピロール構造のアルキル置換の位置や個数により活性が大きく変動することが分かった。

また、MPPB と 2,5-DP の性能比較ならびに作用の一般性を確認するために、複数の細胞株での応答性を評価した。なお、塩化リチウムが細胞周期を G2/M に偏らせると共に単位細胞あたりの生産性を向上させると報告されており、MPPB と類似の効果を有しているため塩化リチウムも比較対象として評価した。その結果、MPPB と 2,5-DP の特性は複数の細胞株に渡って同様の効果を有し、塩化リチウムよりも低濃度で同等の効果を有することを明らかにした。

本博士論文では、上記の MPPB を見出した経緯に加え、MPPB とその活性中心である 2,5-DP が rCHO 細胞培養に与える影響ならびに、その作用の一般性を評価した結果を以下四章に渡って述べ、最後に結論として全体を総括する。

第二章では、スクリーニングにより MPPB を選定するまでの経緯を述べる。

第二章一節(2.1.)では 96 well plate とフラスコを用いた低分子化合物の 1 次・2 次スクリーニングの結果と MPPB を選定した経緯を述べ、第二章二節(2.2.)では 2 次スクリーニングのヒット化合物の化学構造と培養結果との関連性を化学構造面から考察する。

第三章では、MPPB による培養ならびに mAb 品質への影響をバッチ培養、フェドバッチ培養の結果から述べ、第三章一節(3.1.)ではバッチ培養による MPPB の特性解析の結果を細胞の増殖性やグルコースの消費量、mAb の発現効率の面から述べる。第三章二節(3.2.)では MPPB の高次評価をバッチ培養ならびにフェドバッチ培養で実施した結果を述べ、本章の最後である第三章第三節(3.3.)では MPPB の最適な添加方法に関して考察する。

第四章では MPPB の化学構造と活性の関係に関して述べる。第四章一節(4.1.)では MPPB の活性中心を調査した結果と活性中心であった 2,5-DP の周辺化合物と rCHO 細胞による mAb 生産性

との構造活性相関に関して述べる。第四章二節(4.2.)では 2,5-DP の高次評価をバッチ培養ならびにフェドバッチ培養で実施した結果を述べる。

そして第五章では MPPB ならびに 2,5-DP を複数の細胞株に適応した結果と MPPB に近似した特性を持つと推測される塩化リチウムとの比較実験の結果を述べ、第六章で結論を述べる。

なお、本論文中には各々の実験の目的に応じてフィードを添加しないバッチ培養と、医薬品の mAb 生産にも使用されるフィードを添加し長期培養を実施するフェドバッチ培養とを使い分けている。主に迅速に結果を得ることが重要な化合物のスクリーニング時や化合物の添加のみによる培養中の単位細胞あたりのグルコース消費量の変化などを分析したい場合には、3,4 日で培養結果が得られると共にフィードによる外乱の無いバッチ培養を選択し、医薬品の mAb 生産に近い環境で化合物の影響を評価したい場合にはフェドバッチ培養を選択した。

## 2. rCHO 細胞培養における mAb 生産性を向上させる低分子化合物の選定

mAb 生産性を向上させる低分子化合物を探索する場合、既存の mAb 生産性を向上させる低分子化合物の構造を変換して得た一連の化合物の中から更に高活性な化合物を探索する方法と、多くの既知の低分子化合物のランダムスクリーニングにより活性な低分子化合物を見つける方法とが考えられた。ランダムスクリーニングによる探索方法は、有望な低分子化合物を見つけることができない可能性がある一方で、これまで rCHO 細胞培養に影響するとは知られていない新規化合物を発見できる可能性がある。未知の添加化合物を発見することを目的とする本研究では、ランダムスクリーニングが目的に適うため、この方法による探索を実施する方針とした。ランダムスクリーニングを用いた探索研究の成否は、如何に多くの低分子化合物を迅速に評価できるかに依存する。従って、豊富な低分子化合物ライブラリの入手と効率的なスクリーニング系の確立が重要である。本研究では構造が多様で構成数が多い低分子化合物ライブラリが必要のため、ある程度纏まった医薬品や天然物などを持つ組織からのライブラリの入手を検討した。その際、化合物の類縁体も評価するために低分子化合物の合成を研究しており、その合成中間体もライブラリのバリエーションとして提供している組織を活用する方針とした。調査の結果、アカデミアのライフサイエンス研究の成果を医薬品等の実用化に繋げる事を目的とし、複数の大学が参画し外部の研究組織を支援する体制を構築している BINDS が最大 28 万種の化合物ライブラリを有することがわかった。そこで、本研究では、BINDS に参画している組織の中でも低分子化合物の合成研究を実施している東京大学の小島宏建先生、大阪大学の辻川和丈先生、東北大学の土井隆行先生らの元から総計 23,227 個の低分子化合物ライブラリを入手して探索研究を実施する方針とした。また、効率的なスクリーニング系としてウェルプレートを用いた多検体を培養可能な系と Octet QK<sub>e</sub>を用いた mAb 発現量の一斉分析系を採用した。

## 2.1 96 ウェルプレートとフラスコを用いたスクリーニングによる低分子化合物の選定

### 2.1.1 96 ウェルプレートを用いた評価系の構築

化合物スクリーニングを実施するにあたり、最初に効率的なスクリーニング系を確立した。高速スクリーニングのためには多検体を一斉に処理できる仕組みが必要であり、細胞培養ではウェルプレートを用いた多検体処理が一般的である。そこで本研究においてもウェルプレートを用いた実験系を構築した。数あるウェルプレートのラインナップの中で、培養液を各種の測定で使用することを想定して1ウェルあたり200  $\mu\text{L}$  の液量で培養可能な96ウェルプレートを用いる方針とした。

まずは、96ウェルプレートを用いたスクリーニングの妥当性を確認するために、ウェルプレートの全面に培養液を仕込み3日間培養後、Octet QK<sub>e</sub>を用いウェルプレート全面のmAb濃度を測定し、mAb濃度の分布から系の均一性を判断した。なお、培養条件は後述する1次スクリーニングのコントロール条件に同じである(Table 2)。

Table 2 96 ウェルプレートを用いたスクリーニング系の均一性評価

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	61	59	62	62	68	71	71	70	69	74	66	69
B	61	57	57	59	55	61	64	65	65	67	64	62
C	58	55	54	51	60	54	58	58	60	60	63	62
D	58	57	53	53	54	53	54	56	56	60	60	63
E	59	56	53	54	52	53	55	53	54	57	59	59
F	62	58	56	55	54	53	56	55	57	57	61	61
G	59	58	58	58	57	56	58	56	56	57	59	58
H	58	61	60	60	60	60	60	59	58	60	60	58

	Average (mg/mL)	SD (mg/mL)	CV (%)
Control	58.9	4.6	7.8

Table(上):プレートマップ、Table(下):結果の統計解析結果

プレートマップの外側(白色マス):ウェルナンバー(A-H, 1-12)

プレートマップの内側(黄色マス):コントロール群の mAb 濃度 (mg/mL)

評価の結果、ウェルプレート外周に近いウェルの mAb 濃度が高いために SD は 4.6 (mg/mL) であるが、CV は 7.8% であり一般的にスクリーニング時に必要とされる 10% 以内の基準を満たしており、ウェル毎の変動がスクリーニングの実施に問題ない程度であると判断した。なお、ウェル外周の mAb 濃度が高い理由は、培養中の液の揮発によるものと推測される。

次に、実際のスクリーニング時の挙動を確認するために化学シャペロンとして働き、ある種のタンパク質の産生量を向上させると知られている 4-PBA<sup>26, 27</sup> をポジティブコントロールとして添加した実験を行った (Table 3)。なお、培養条件は後述する 1 次スクリーニング条件に同じである。

Table 3 4-PBA を用いた評価系の挙動確認

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	77	10	10	9	10	9	10	10	10	9	9	86
B	74	9	9	9	9	9	8	10	10	10	10	80
C	66	10	10	9	9	9	10	9	10	9	10	71
D	65	10	9	9	9	9	9	9	9	10	9	66
E	64	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	62
F	62	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	65
G	64	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	61
H	62	9	9	9	8	9	9	9	9	9	10	60

	Average (mg/mL)	SD (mg/mL)	CV (%)	S/B比	Z'-factor
Control	67.8	7.4	10.9	2.4	0.6
4-PBA add.	9.2	0.4	4.5		

Table(上): プレートマップ、Table(下): 結果の統計解析結果

プレートマップの外側(白マス): ウェルナンバー (A-H, 1-12)

プレートマップの内側(黄色マス): コントロール群の mAb 濃度 (mg/mL)

プレートマップの内側(青色マス): 4-PBA 添加群の mAb 濃度 (mg/mL)

実験の結果、4-PBA の添加は本研究で使用している rCHO 細胞の mAb の発現量向上には結びつかず、逆に発現量を低下させる結果となった。しかし、コントロール群との対比例としては使用できると考えてスクリーニング系の妥当性を評価した。コントロール群の SD は 7.4 (mg/mL)、CV は

10.9%であり先の結果より CV が高いが概ね 10%以内に近いため許容とした。また、4-PBA 添加群の SD は 0.4 に対し、CV は 4.5%であり問題のない結果であった。更にコントロール群と 4-PBA 添加群のシグナル感度比を示す S/B 比は 2.4 であり最低限必要とされる 2 以上を達成しており、アッセイ系の精度を示す Z'-factor も必要とされる 0.5 を上回る 0.6 であった。以上のことから、96 ウェルプレートを用いた化合物のスクリーニング系は、プレート全体の培養条件に均一性があり、化合物添加時の影響を 4-PBA 添加時程度の差があれば明確に判断できる条件であることが確認された。

## 2.1.2 96 ウェルプレートを用いた 1 次スクリーニング

BINDS から収集した低分子化合物 23,227 個を 96 ウェルプレートで 3-4 日間、37 °C、5%CO<sub>2</sub> の条件で培養し Octet QK<sub>6</sub>を用いて mAb の発現量を評価した。結果を Figure 10 に示す。

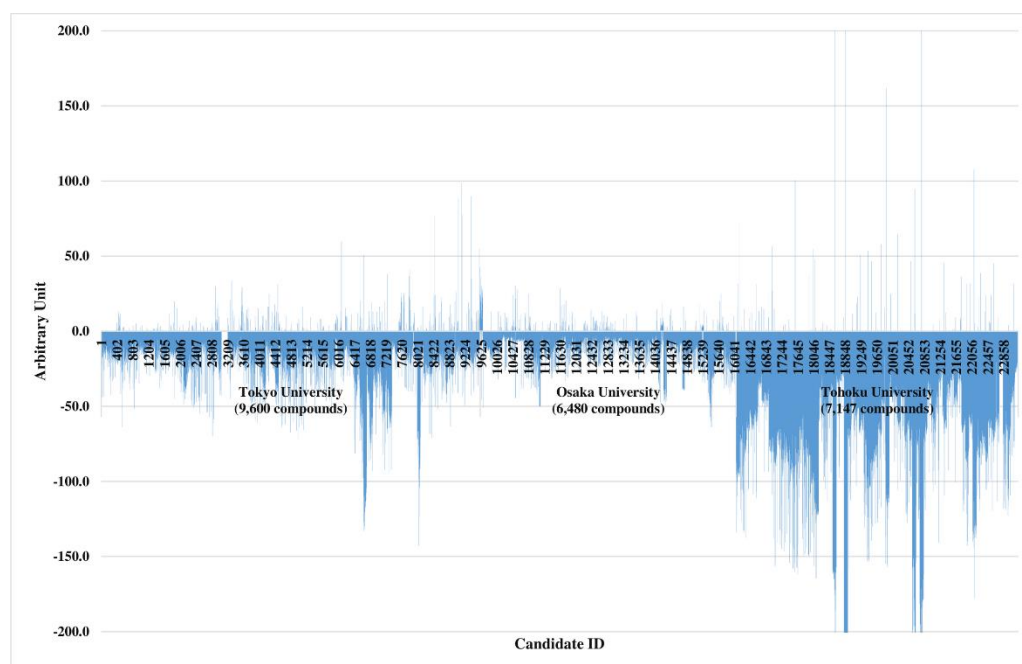


Figure 10 96 ウェルプレートを用いた低分子化合物群の 1 次スクリーニング結果

化合物を添加した際の発現量がコントロール群より有意に高くなったと判断するための基準として、発現量がコントロール群の平均値+3SD を超えた場合に有意と判断する基準を設けた。これはコントロールの値の変動幅は正規分布に従い SD の 3 倍の振れ幅に 99.7%が収まると考え、コントロール群の平均値+3SD を超えた場合は 99.7%の確率で有意に化合物添加の添加が mAb 生産性の増加に寄与したとの考えに基づく。その結果、23,227 個の化合物の内 2.5%に相当する 566 個の化合物が mAb の生産性の増加に寄与する可能性があることが分かった。

次に、96 ウェルプレートから shaker flask にスケールを上げて検証する為に 566 個の化合物の入手性を確認したところ、68 個の化合物は市販されており、5 個の化合物は類似化合物として入手

可能であると分かった。これら 73 個の化合物を 2 次スクリーニング用のライブラリとし、50 mL 浮遊培養フラスコを用いた培養評価を実施した。



### 2.1.3 50 mL 浮遊培養フラスコを用いた 2 次スクリーニング

1 次スクリーニングの結果選定された 73 個の化合物を 50 mL 浮遊培養フラスコで 3 日間、37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件で培養し HPLC を用いて mAb の発現量を評価した。その結果を Figure 11 に示す。

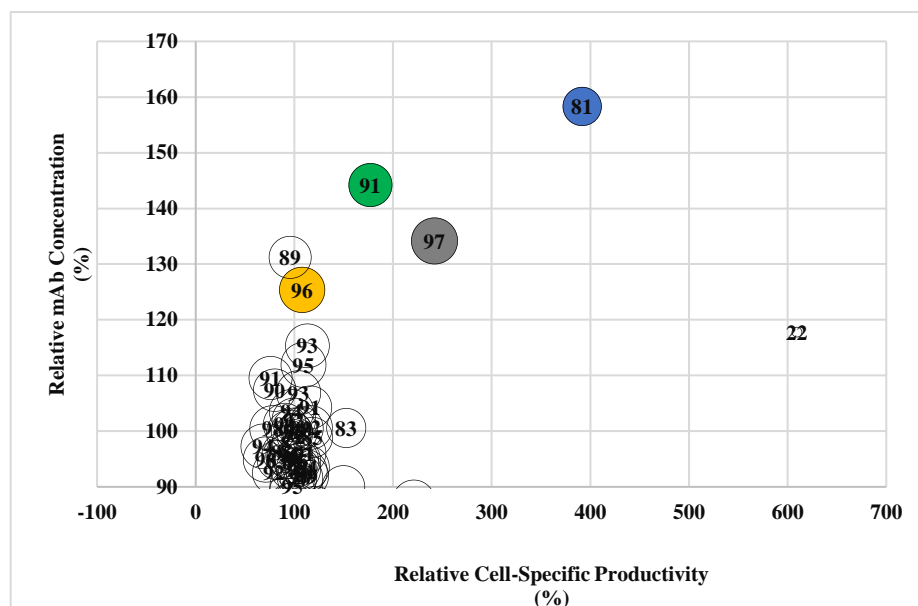


Figure 11 50 mL 浮遊培養フラスコを用いた 2 次スクリーニング結果

縦軸: Relative mAb Concentration (%), 横軸: Relative Cell-Specific Productivity (%), 円内の数字: 細胞生存率 (%). 黄色: 候補化合物 No. 67, 緑色: 候補化合物 No. 35, 灰色: 候補化合物 No. 62, 青色: 候補化合物 No. 42

73 個の化合物をスクリーニングした結果、幾つかの化合物では、1 次スクリーニング時と同様にコントロールよりも目的抗体濃度と CSPR の上昇が見られた。有効な化合物の選定基準として、コントロールに対する培養終了日の抗体濃度の相対値が 120%以上、CSPR の相対値が 105%以上、細胞生存率 80%以上という値を設けた。その結果、4 つの候補化合物が選定された(候補化合物 No.35, 42, 62, 67)。抗体濃度の相対値と CSPR の相対値は、No.35 で各々144%と 177%、No.42 で各々158%と 392%、No.62 で各々134%と 242%、No.67 で各々125%と 108%であり、本実験では

No.42 が最もポテンシャルが高い結果となった。本実験は N=1 の実験であるため、再現性を評価するために選定した 4 化合物を N=3 で評価し、結果を再確認した。

### 2.1.4 2次スクリーニング結果の再現性確認ならびに化合物の選定

2次スクリーニングと同様の培養条件で N=3 で培養を実施した結果を Figure 12 に示す。

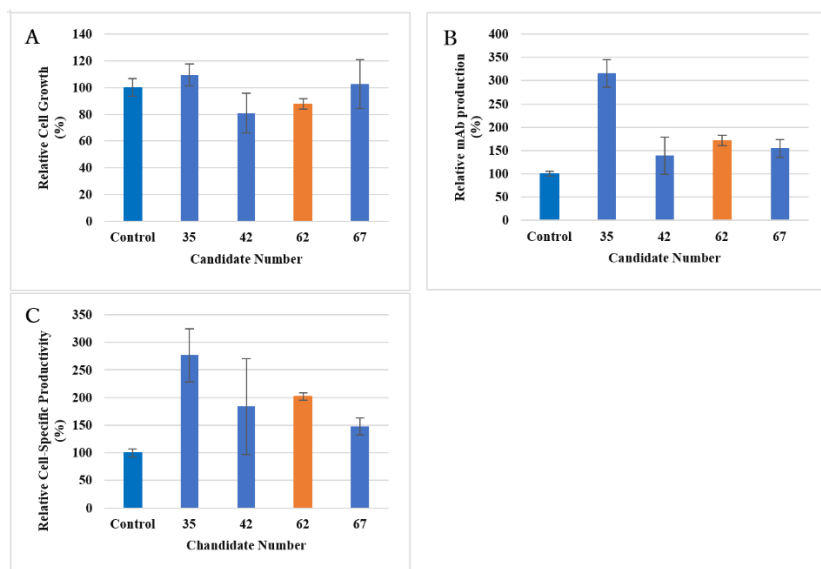


Figure 12 2次スクリーニングで得られた4化合物の再現性の評価

細胞増殖濃度の相対値(A)、mAb濃度の相対値(B)、CSPRの相対値(C)

コントロール条件に対し、化合物 No.42 においては細胞増殖濃度、mAb 濃度、CSPR の全ての評価項目においてロット間の変動が大きいため有意性が見られなかった。一方、化合物 No.62 では10%程度の細胞増殖性の低下がみられたが、mAb 濃度、CSPR 共にコントロールよりも高い結果であった。中でも化合物 No.35 における mAb 濃度と CSPR の上昇度が最も高く各々316%、277%であり、次に化合物 No.62 が高く各々171%、202%であった。化合物の構造を Figure 13 に示す。

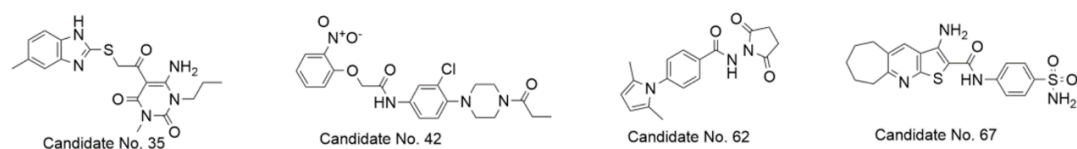


Figure 13 再現性を評価した4化合物の化学構造

医薬品の製造プロセスに化合物を添加する場合には、化合物の活性のみならず化合物の入手性も重要である。また、本研究を進める上で化学構造と rCHO 細胞への活性との間の構造活性相関を調査する場合には化学構造の変換の容易さも重要となる。化合物 No.35 による抗体生産性への寄与は最も良い結果であったが、その化学構造は複雑であると共に入手性が悪く(400,000 円/g)、今後の研究推進の障害になることが考えられた。そのため今回の研究では化学構造が単純であり容易に構造を変換でき、入手性も良い(100,000 円/g) No.62 の化合物 MPPB を今後の研究対象として選定した。なお、MPPB は抗マラリア薬として<sup>28-30)</sup>インドの S.E.T's 薬科大学で開発された化合物群の 1 つである。

## 2.2 2次スクリーニング時の高評価化合物の化学構造

2次スクリーニング時に mAb 濃度が 105%以上向上した化合物の一覧を Figure 14 に示す。これら化合物の共通構造を確認したところ、明確に類似していた化合物は候補化合物 No.62 と No.90 であり、構造的な違いは化合物の末端がアセテートであるかスクシンイミドであるかのみで、2,5-DP 部位や 4-アミノ安息香酸部位は全く同じであった。他の類似部分構造としては、候補化合物 No.62 と No.90 に存在するヒドラジン構造が No.89 にも含まれている。

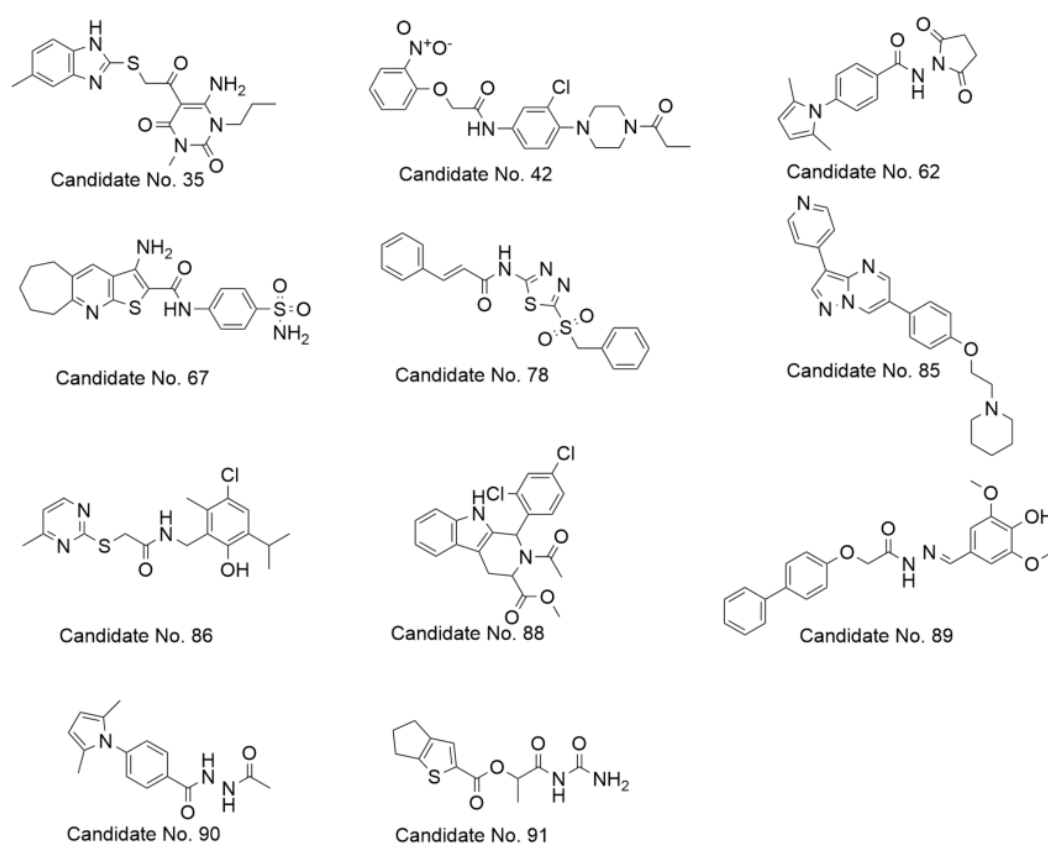


Figure 14 2次スクリーニング時の高評価化合物の化学構造

## 2.3 考察

96 ウェルプレートを用いたスクリーニングにおいては 96 ウェルプレートプレートの端に近いほど培地の蒸発が生じ mAb 濃度が高くなる現象が見られる (Table 2)。この現象が、どの程度スクリーニング時の擬陽性としてヒットしてくるかが当初懸念された。しかし、スクリーニング時のヒット数は 23,227 個の化合物の内 566 個であり、その率は 2.5%であった。仮に 96 ウェルプレートの端である A2-A11, H2-H11 の位置が全てのプレート (ca.290 枚) においてコントロールより有意に高い mAb 濃度であった場合のヒット率は 25%となる。今回のヒット率 2.5%はそれより十分に低いことから、統計的な判断ではないが、培地の蒸発により擬陽性を示す可能性は低いと推定され、本スクリーニング系は当初の検証通り適切であったと判断した。なお、本研究を推進する上では擬陽性率は低いと判断したが、一般的な医薬品開発における HTS のヒット率が 0.01~0.14%<sup>31)</sup>であることを考慮すると、本研究におけるヒット率 2.5%は 10 倍程度高いことから、相対的な問題ではあるが、一般的な医薬品の探索よりは高率で擬陽性が含まれている可能性は否定できない。今後の研究において 1 次スクリーニングのヒット化合物 566 個の内から新たな有益な化合物を見出そうとする場合には、rCHO 細胞による mAb 生産性向上が真に見られるかを再評価すべきと考えた。

今回、1 次スクリーニングで得られた 566 個の化合物を 2 次スクリーニングに向けて必要量を確保するにあたり有機化合物の卸業者数社に入手を依頼した。しかし、ヒットした化合物の多くは企業や大学などの外部機関が研究過程で試験的に合成した化合物であるため、入手性が低く、医薬品合成中間体の製造を請け負う ATTO 株式会社によるオーダーメイドのみが入手手段であった。そのため合成難易度や購入費用の観点から 566 化合物全てを調達することはできず 73 化合物の入手に留まった。本研究の目的は rCHO 細胞の mAb 発現量の向上に影響を与える新規化合物の探索であるため世の中の的に知名度の低い化合物を利用できることは非常に魅力的であるが、入手性が低い化合物を扱う場合には研究推進が難しくなる。そのため mAb 生産性向上への効果が高い化合物の有用性を意識しながらも、化合物の入手性や化合物の化学構造の変換の容易さも化合物選定の評価項目に入れる方針とした。

73 化合物の 2 次スクリーニングの結果 (Figure 11)、候補化合物 No.35、42、62、67 による mAb 濃度と CSPR の向上を確認できた。2 次スクリーニング後のこれらの候補化合物の再現性の確認実験においても、化合物 No.42 を除いてコントロールより高い結果となった (Figure 12)。No.42 に関しては SD が大きいと有意差がみられていないが、平均値はコントロールより高いと SD の幅を考慮するとコントロールより高い結果となる可能性はあると考える。一方、2 次スクリーニング時には、mAb 濃度は化合物 No.42、62、35、67 の順に高い結果であったが、再現性の確認実験時には化合物 No.35、62、67、42 の順に高く、2 つの実験結果は完全には一致していない (Figures 11 and 12)。この差の一因として、No.35、42 は DMSO の懸濁液であり他の化合物の様に完全溶解していないためピペットでの均一なサンプリングができず、正確な量を添加できなかったと推測される。

再現性の確認実験では最も mAb 生産性を向上させた化合物は No.35 であったが、先述したように DMSO に低溶解性のため懸濁液として扱わなければならない欠点があり、今後の試験において正確な量を添加し難く、医薬品の製造に適応する場合には培地の無菌ろ過時に除去されてしまうことが想定される。更なるその化学構造にはモノメチル化されたベンゼン環や非対称にアルキル化されたピリミジン環など合成上難しい構造を有するため、今後の研究を進める上での物量入手や構造活性相関時の化学変換の困難さが予測された。よって、低溶解性のため培養液に添加し難いと共に入手性が低く、構造変換が難しい No.35 は本研究には不向きと判断した。そこで、2 番目に mAb 生産性を向上させた No.62 (以後、MPPB) を今回の研究対象として選定した。なお、MPPB は DMSO への溶解性が高く研究時に使用する濃度 100 mg/mL に十分可溶であると共に、構造的にもピロール、スクシンイミド、アミノ安息香酸の 3 部位からなる単純な化合物であるため構造活性相関を実施し易い利点がある。

MPPB や No.35、42、67 に加え、添加により mAb の濃度がコントロールに対して 105%以上向上した化合物は 11 種あった。これらのうち、明確に共通している構造は MPPB (No.62) と No.90 のピロールとアミノ安息香酸部位であり、MPPB と No.90 の活性部位はこれら 2 つの部位にあることが推定された。一方、ヒドラジン骨格も共通構造として MPPB と No.90、および、No.89 に存在する。ヒドラジンは単独では毒物であるが、還元力を有することが知られている。従って、ヒドラジン構造が rCHO

細胞の活性化に寄与しているのであれば、グルタチオンの様な還元性化合物として ROS などからのストレスの低減に関与している可能性が考えられる<sup>32-34)</sup>。



## 2.4 小括

BINDS (東京大学、大阪大学、東北大学) から入手した 23,227 個の低分子化合物を、96 ウェルマイクロプレートを用いて 1 次スクリーニングし、コントロールの平均値+3SD より大きい mAb 濃度を示した化合物 566 個を選定した。566 化合物の内、10 mg 以上の物量を入手可能な 73 化合物を主に医薬品中間体の受託合成を行っている ATTO 株式会社から入手し 2 次スクリーニングを実施した。2 次スクリーニングの結果、mAb 濃度と CSPR の相対値ならびに細胞生存率が各々コントロールの 120%、105%、80%以上を示す化合物 4 種 (No.35, 42, 62, 67) を選定した。これら 4 種の再現性の確認実験を実施したところ、最も良い結果を示した化合物は No.35 であったが、難溶性などの物性の悪さや化学構造上の複雑さによる構造活性相関を実施し難いなどの欠点があった。そのため、良溶性で化学構造が単純な MPPB を本研究の研究対象として選定した。なお、2 次スクリーニングで CSPR がコントロールに対し 105%以上向上した化合物の化学構造の類似性を評価したところ、大部分は共通構造を持たないが MPPB と No.90 がピロールならびに 4-アミノ安息香酸の共通構造を持つなど、MPPB の有望性を高める知見が得られた。なお、今回は物性や構造上の複雑さから不選定とした No.35 については、物性を改善する方向性で化学構造を改変、単純化することにより有望な化合物に誘導できると期待される。

### 3. MPPB の特性解析と培養への影響評価

第三章第一節(3.1.)では、第二章で見出した MPPB が rCHO 細胞に与える影響を評価した結果を述べる。評価系としてフィードやグルコースなどの添加による外乱が少なく化合物自体の影響評価に適しているバッチ培養を選択した。バッチ培養の期間は 4 日間の短期間とし、MPPB 濃度に対する rCHO 細胞の各種プロファイルの MPPB 濃度への依存性を評価した。評価の結果、CSPR 並びに単位細胞あたりのグルコース消費量が向上することが判明した。その原因究明のために細胞内 ATP 濃度の測定も併せて実施した。また、先述したように、rCHO 細胞に作用して目的タンパク質濃度や CSPR を向上させる既存の化合物の多くは細胞周期に影響することから、MPPB による rCHO 細胞の細胞周期への影響も併せて評価した。

第三章第二節(3.2.)では、MPPB 濃度を最適化した条件で細胞生存率が 70%を下回るまでバッチ培養ならびにフェドバッチ培養を実施し、MPPB 非添加の培養時との比較実験を行った結果を示す。評価項目として、生細胞密度、細胞生存率、mAb 濃度、CSPR、グルコース濃度変化、ラクテート濃度変化、単位細胞あたりのグルコース消費量、単位細胞あたりのラクテート生産量を選定した。なお、本論文では、乳酸の定量時に乳酸自体と乳酸の塩またはイオンと区別せずに検出しているため、総称して「ラクテート(lactate)」と表記している。また、先述したように rCHO 細胞に作用し目的タンパク質濃度や CSPR を向上させる既存の化合物は mAb の糖鎖修飾にも影響することが報告されているため、フェドバッチ培養においては N 型糖鎖への影響評価も併せて実施した。

第三章第三節(3.3.)では、バッチ培養において MPPB の添加方法を検討した結果を示す。前節の結果として MPPB は細胞増殖を抑制する一方で細胞生存率を維持する特性を有したため、MPPB の添加方法の最適化により細胞増殖抑制を制御して更なる rCHO 細胞の生産性向上の可能性を評価した。

### 3.1 バッチ培養による MPPB の特性解析

#### 3.1.1 rCHO 細胞培養時の MPPB の適正濃度

rCHO 細胞培養時の MPPB の適正濃度を解明するために MPPB 濃度 0.08-1.28 mM の範囲で調査した (Figure 15)。

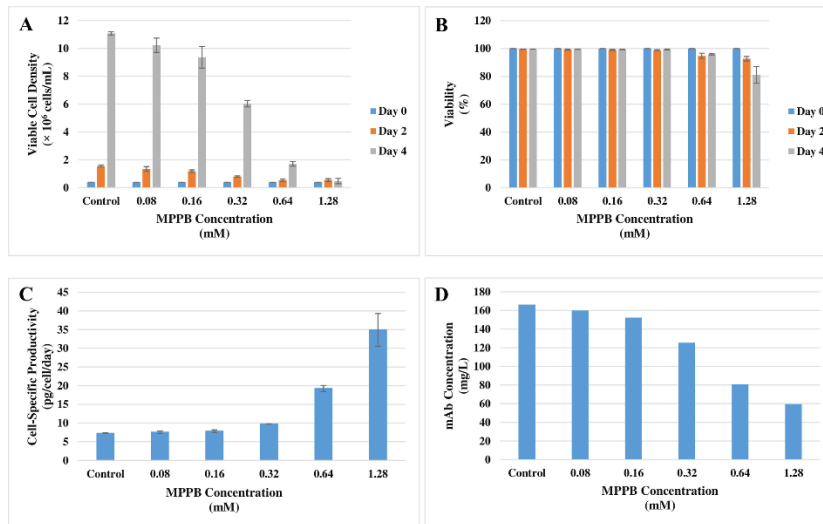


Figure 15 rCHO 細胞の MPPB 濃度依存性

生細胞密度の濃度変化 (A)、細胞生存率の変化 (B)、CSPR の変化 (C)、mAb 濃度の変化 (D)

MPPB 濃度の増加と共に、生細胞密度、細胞生存率と mAb 濃度は低下し、CSPR が増加する傾向が見られた。検討した範囲では 0.08 mM の濃度から生細胞密度の低下が始まり 1.28 mM では完全に細胞増殖は停止した。CSPR は 0.32mM から顕著に増加し始め 1.28 mM ではコントロールの 5 倍まで増加した。一方で 1.28 mM では細胞生存率が明確に低下することから MPPB の適正な添加濃度は 0.32-0.64 mM と判断した。

### 3.1.2 rCHO 細胞の代謝への MPPB の濃度依存性

Becker<sup>35)</sup>らおよび Hara、Kondo<sup>36)</sup>らは、細胞内 ATP 量の増加が目的タンパク質の生産性の増加に寄与していることを報告している。MPPB が CSPR を向上させた理由は細胞内 ATP 量の増加にあると推定し、ATP 産生に関連する単位細胞あたりのグルコースの消費速度と細胞内 ATP 量を調査した (Figure 16)。

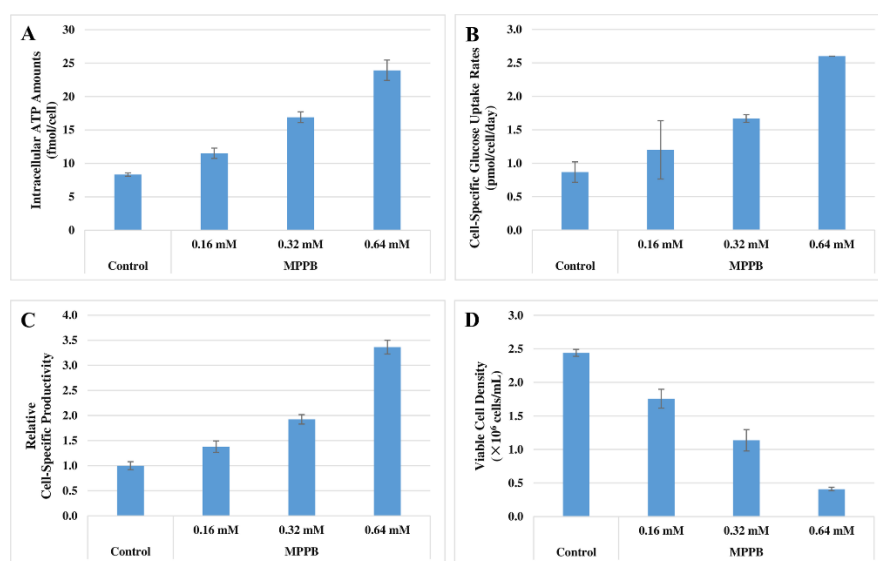


Figure 16 細胞内 ATP 量と単位細胞あたりのグルコース消費速度

MPPB 添加濃度 0.16-0.64 mM 時の培養 3 日目の細胞内 ATP 量 (A)、単位細胞あたりのグルコース消費速度 (B)、CSPR (C)、VCD (D)。

調査の結果、細胞内 ATP 量は 8 fmol/cell から 24 fmol/cell まで増加し (Figure 16A)、単位細胞あたりのグルコース消費速度は 0.9 pmol/cell/day から 2.6 pmol/cell/day まで増加した (Figure 16B)。CSPR も MPPB の濃度の増加と共に増加することから CSPR と細胞内 ATP 量および単位細胞あたりのグルコース消費速度は正の相関があると分かった (Figure 16C)。また、MPPB による細胞増殖の抑制には再現性が見られ MPPB 濃度の増加に対して負の相関を示した (Figure 16D)

### 3.1.3 MPPB の細胞周期への影響

前述のように、mAb の生産を調節する既存の化合物の添加時には細胞周期が変化することが知られていることから、MPPB が G0 フェーズ、S フェーズ、G2/M フェーズのどの周期に細胞周期を偏らせる化合物であるかを調査した (Figure 17)。

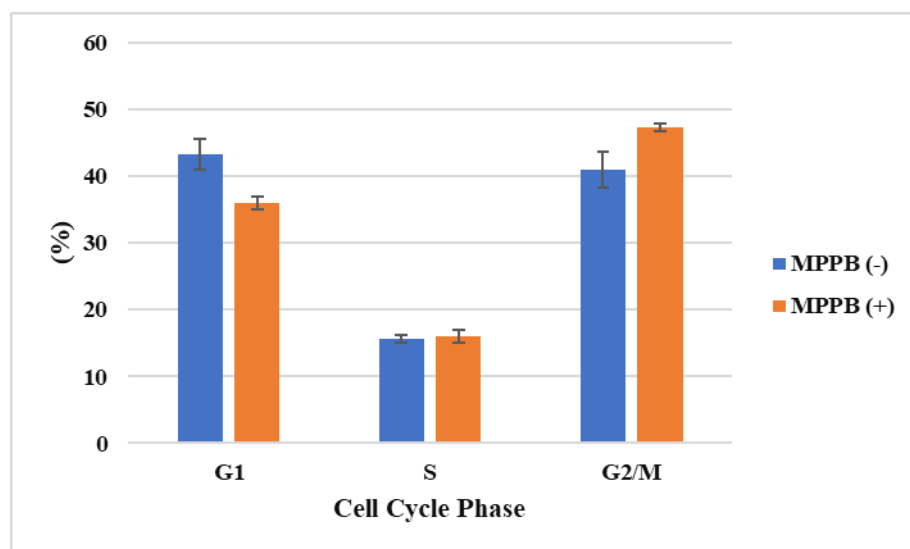


Figure 17 MPPB の添加による rCHO 細胞の細胞周期の変化

0.64 mM の MPPB 共存下で 4 日間培養した rCHO 細胞の細胞周期を測定した。

MPPB を 0.64 mM 添加した場合の細胞周期を MPPB 非添加時の細胞周期と比較した結果、MPPB 添加により G1 フェーズが 43% から 36% に減少し、G2/M フェーズが 41% から 47% まで増加した。なお、MPPB の有無に拘らず S フェーズはいずれも 16% で変化は無なかった。本検討により MPPB は rCHO 細胞の細胞周期を G1 フェーズから G2/M フェーズに偏らせる化合物であることを明らかにした。

## 3.2 MPPB 共存下でのバッチ培養ならびにフェドバッチ培養における長期培養

### 3.2.1 MPPB 共存下でのバッチ培養における長期培養の結果

MPPB 共存下で細胞生存率が 70%未満に達するまでバッチ培養を続けた場合の影響評価を実施した。MPPB の添加効果のみを評価するため、pH、グルコース濃度の維持など一切の培養条件の調整を実施しなかった (Figure 18)。

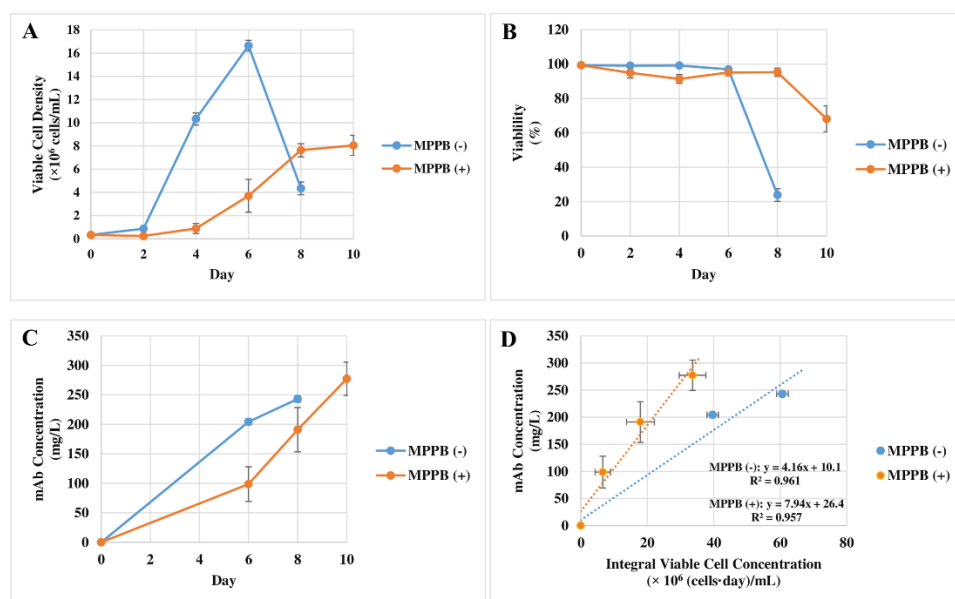


Figure 18 MPPB 共存下バッチ培養における長期培養の評価 (1/2)

0.64 mM MPPB 共存下で細胞生存率が 70%未満になるまで培養を継続し 2 日おきに VCD (A)、細胞生存率 (B)、mAb 濃度 (C) を測定した。また、IVCC に対する mAb 濃度の傾きから CSPR (D) を算出した<sup>37)</sup>。

最大 VCD は、MPPB 処理により  $16.6 \times 10^6$  cells/ mL から  $8.0 \times 10^6$  cells/ mL に減少した (Figure 18A)。一方、MPPB 非添加のコントロール条件が培養 8 日目で細胞生存率が 70%未満になったのに対し、MPPB を添加した条件では培養 10 日目まで細胞生存率を維持した (Figure 18B)。一方、MPPB 添加条件下での mAb 濃度は、培養終了時点では MPPB 無添加条件の場合

とほぼ同じ値であった (Figure 18C) なお、MPPB の添加により CSPR が 4.2 pg/cell/day から 7.9 pg/cell/day まで増加する現象はスクリーニング時と同様に再現された (Figure 18D)。

次に、培養中のグルコースやラクテートの濃度変化並びに単位細胞あたりの各々の消費量、生産量を示す (Figure 19)。

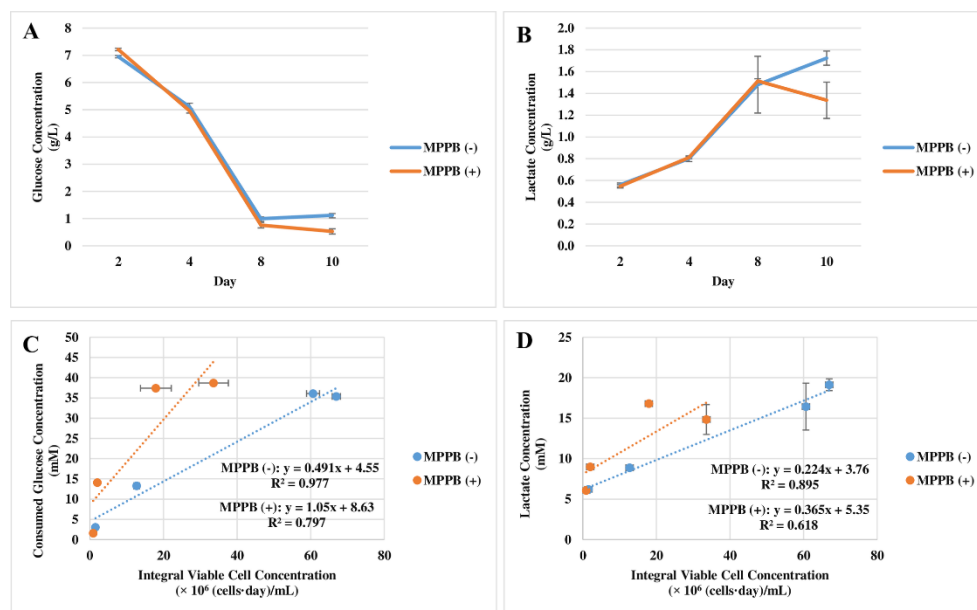


Figure 19 MPPB 共存下バッチ培養における長期培養の評価 (2/2)

0.64 mM MPPB 共存下で細胞生存率が 70%未満になるまで培養を継続し 2 日おきに培養中のグルコースの濃度 (A)、ラクテートの濃度 (B) を測定し、IVCC に対する消費グルコース濃度の傾きから単位細胞あたりのグルコース消費量 (C) を算出し、IVCC に対するラクテート濃度の傾きから単位細胞あたりのラクテートの生産量 (D) を算出した。

培養上清分析の結果、グルコースおよびラクテートの濃度は、MPPB の有無に拘らず同じ推移を示した (Figure 19A and B)。しかし、単位細胞あたりのグルコース消費速度は、MPPB の添加により 0.49 pmol/cell/day から 1.1 pmol/cell/day まで増加した (Figure 19C)。一方、単位細胞あたりのラクテートの生産速度は MPPB の添加により 0.22 pmol/cell/day から 0.37 pmol/cell/day の増加に留まった (Figure 19D)。即ち、MPPB 添加による単位細胞あたりのグルコース消費速度の増加は 0.61

pmol/cell/day の増加であるのに対し単位細胞あたりのラクテートの産生速度は 0.15 pmol/cell/day であることから、消費量が増加したグルコースが効率よくトリカルボン酸 (TCA) 回路を介して ATP に変換されたことを示唆している<sup>38)</sup>。



### 3.2.2 MPPB 共存下でのフェドバッチ培養における長期培養の結果

フェドバッチ培養はフィード培地の添加により培養液中の栄養素が変動するため培養結果の解析難易度が向上するが、細胞が長期的に維持され mAb 発現量が向上するために医薬品製造において多用されている。本研究においても、実際の mAb 生産に近い環境における MPPB の影響評価のためにフェドバッチ培養による再評価を実施した。評価条件としてフィード培地の添加のみを実施した場合と、フィード培地のみではグルコースが枯渇するためにグルコースを別途添加し培養中のグルコース濃度を 1 g/L 以上に維持した培養を実施した (Figure 20)。

グルコース濃度を維持しないフェドバッチ培養において、MPPB 添加条件下での最大 VCD は MPPB 非添加条件の  $21 \times 10^6$  cells/mL に対し  $14 \times 10^6$  cells/mL まで抑制された。一方、グルコース濃度を 1 g/L 以上に維持したフェドバッチ培養においても、MPPB 添加条件下での最大 VCD は MPPB 非添加条件の  $19 \times 10^6$  cells/mL に対し  $15 \times 10^6$  cells/mL まで抑制され、グルコース濃度を維持しない MPPB 添加培養と類似した傾向を示した (Figure 20A)。また、細胞生存率はグルコースを維持しない培養条件下では MPPB 非添加時に培養 8 日目には低下したが MPPB 添加条件下では培養 12 日目まで 70%以上に維持された。グルコースを維持した培養条件下では MPPB 非添加時の細胞生存率の低下は抑制され培養 10 日目まで 70%以上を維持した。なお、MPPB 添加条件の細胞生存率は培養 12 日目まで 70%以上に維持され、グルコース濃度を維持しない場合とほぼ同じ傾向を示した (Figure 20B)。mAb 濃度については、グルコース濃度を維持しない場合、MPPB 添加条件下では VCD が低いにも拘らず 1,098 mg / L に達し MPPB 非添加条件下の 1.5 倍の発現量であったが、グルコース濃度を維持する場合 MPPB 添加により mAb 濃度は 954 mg/L から 858 mg/L まで低下した (Figure 20 C)。CSPR については、グルコースの添加の有無に拘らず MPPB の添加により向上し、グルコース非添加時には MPPB 非添加条件および MPPB 添加条件下での CSPR は各々 7.1 pg/cell/day および 10.5 pg/cell/day、グルコース添加時には各々 7.5 pg/cell/day および 8.8 pg/cell/day であった。

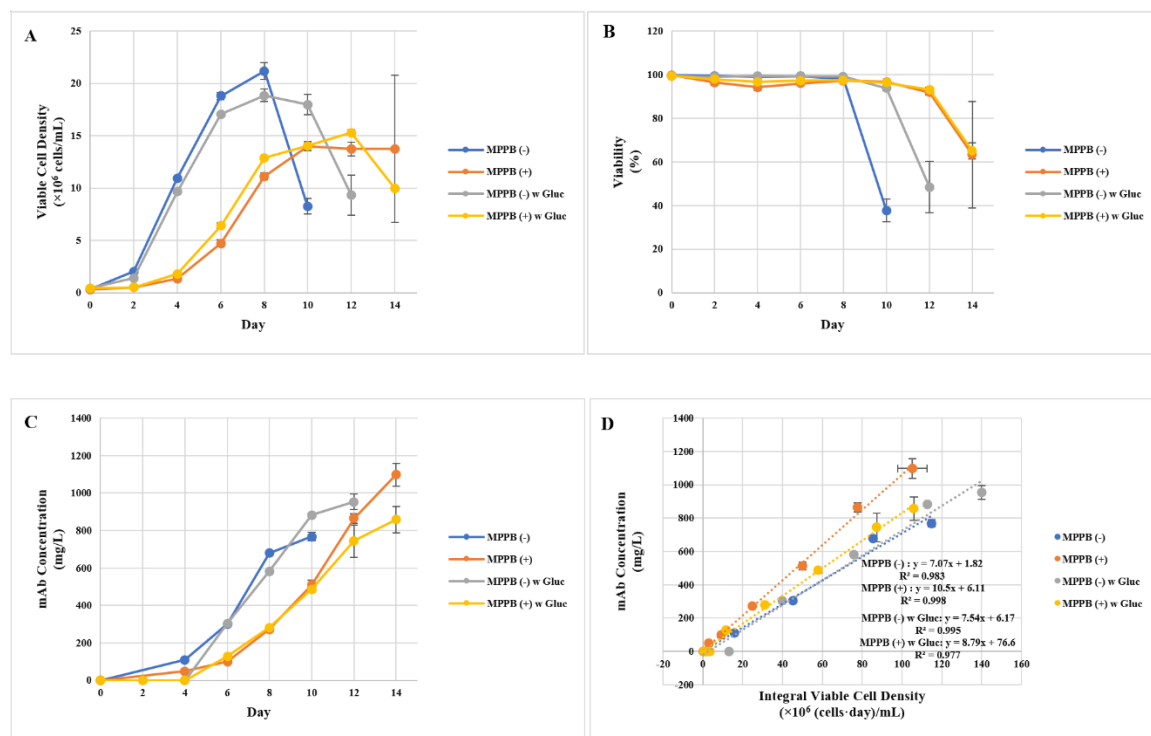


Figure 20 MPPB 共存下フェドバッチ培養における長期培養の評価 (1/2)

0.64 mM の MPPB 共存下で培養を行い、フィード培地を培養開始 2, 4, 6 日目に 2% (v/v) 添加した。MPPB (+) w Gluc と MPPB (-) w Gluc においてはフィード培地の添加に加えグルコースの枯渇を防ぐために 3 g/L 分のグルコースを培養 8, 12 日目に添加した。生細胞密度 (A) および細胞生存率 (B) を 2 日ごとに測定し、細胞生存率が 70% 未満に達するまで細胞培養を続けた。また、IVCC に対する mAb 濃度 (C) の傾きから CSPR (D) を算出した<sup>37)</sup>。MPPB 非添加:MPPB (-)、MPPB 添加:MPPB (+)、MPPB 非添加+Gluc:MPPB (-) w Gluc、MPPB 添加+Gluc:MPPB (+) w Gluc。

次に、フェドバッチ培養における培養上清を分析して、MPPB の有無によるグルコースおよびラクテートの濃度推移を調査し、単位細胞当たりのグルコース消費速度を算出した (Figure 21)。グルコース濃度を維持しない場合、MPPB 非添加時には培養 10 日目にグルコースが枯渇したのに対し、MPPB 添加時には培養 14 日目までグルコースは維持された (Figure 21A)。ラクテート濃度は、グルコースの維持、非維持に拘らず 1 g/L 以下であった (Figure 21B)。単位細胞当たりのグルコース消費速度はグルコース濃度の維持に拘らず MPPB 添加により高まり、グルコースの濃度を維持しない

場合には MPPB 非添加時および MPPB 添加時に各々  $0.62 \text{ pmol/cell/day}$  ならびに  $0.74 \text{ pmol/cell/day}$ 、グルコースの濃度を維持する場合には各々  $0.56 \text{ pmol/cell/day}$  ならびに  $0.66 \text{ pmol/cell/day}$  であった。すなわち、MPPB の添加によりおよそ 20%程度単位細胞あたりのグルコースの消費速度が向上した。

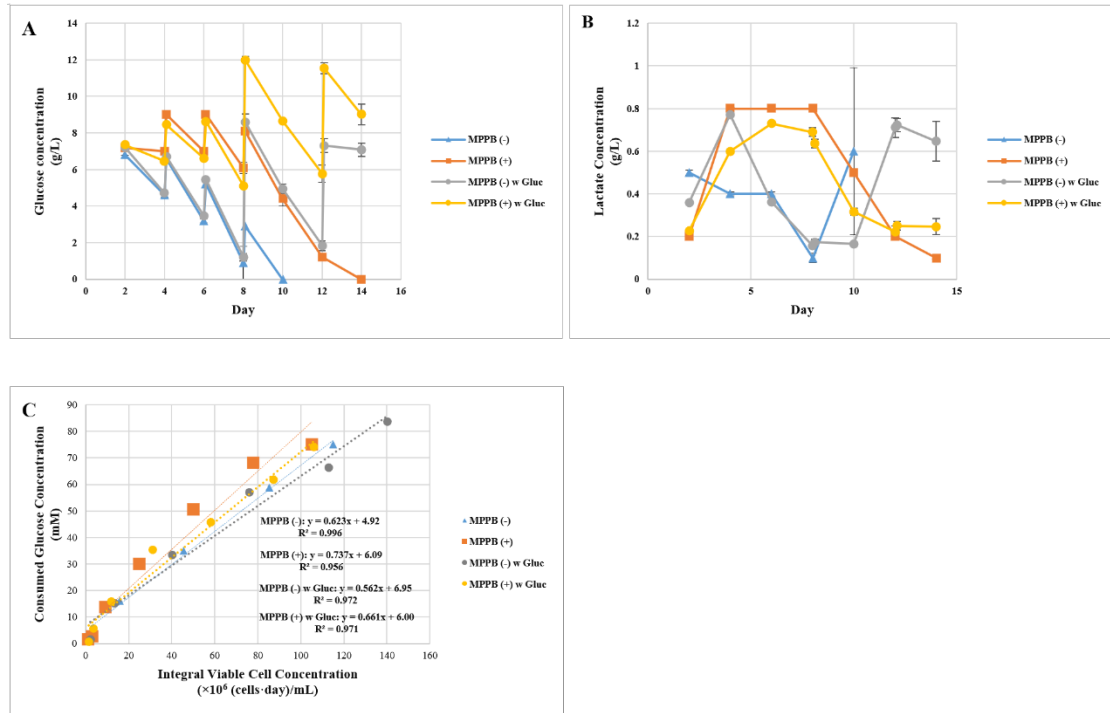


Figure 21 MPPB 共存下フェドバッチ培養における長期培養の評価 (2/2)

グルコースの濃度 (A)、ラクテートの濃度 (B) を測定し、IVCC に対する消費グルコース濃度の傾きから単位細胞あたりのグルコース消費量 (C) を算出した。MPPB 非添加: MPPB (-)、MPPB 添加: MPPB (+)、MPPB 非添加+Gluc: MPPB (-) w Gluc、MPPB 添加+Gluc: MPPB (+) w Gluc。

### 3.2.3 MPPB の N 型糖鎖への影響評価

rCHO 細胞が生産する mAb の糖鎖品質への MPPB の影響を調べるため、グルコース濃度を維持しないフェドバッチ培養の培養最終日の mAb を用い N 型糖鎖分析を実施した (Figure 22)。

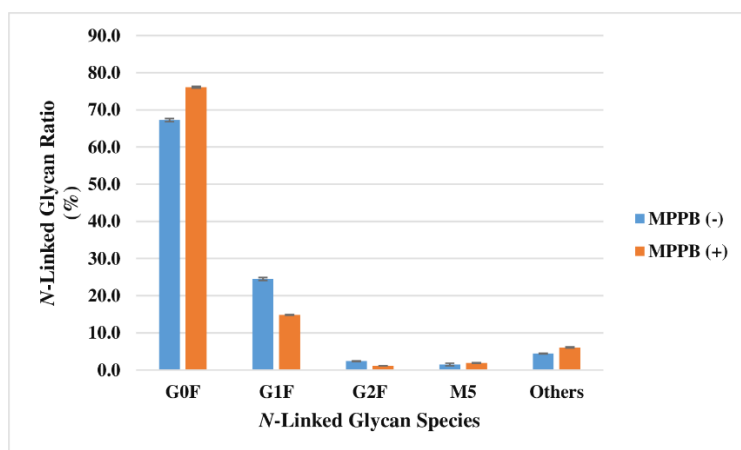


Figure 22 MPPB の N 型糖鎖への影響

各々の N 型糖鎖の比率を全 N 型糖鎖に対する百分率として算出した。

mAb の N 型糖鎖は、ADCC 活性や CDC 活性ならびに in vivo 試験における血中での半減期に影響することが知られており<sup>39-43)</sup>、培養環境に応じて変化することがあることから mAb の主要な N 型糖鎖 (G0F、G1F、G2F、および M5) を、各最終培養日 (MPPB (+): 培養 14 日目、MPPB (-): 培養 10 日目) に調査した。Figure 22 に示すように G2F と M5 の比率は同じであるが、主要な N 型糖鎖である G1F は MPPB 添加により 24.5% から 14.8% に減少した。一方、減少した G1F の多くは G0F の状態で維持された。

### 3.3 バッチ培養における MPPB の添加方法の検討

第三章三節(3.3.)では培養開始時に MPPB を添加した場合の影響の調査結果を述べた。この添加法では、MPPB による CSPR の増加以上に細胞増殖の抑制効果が高いため、mAb 濃度が増加し難い傾向が見られた。そこで、細胞増殖抑制の影響を低減しつつ CSPR を向上させて mAb 濃度の更なる向上を図る目的で、有効添加濃度 0.32-0.64 mM の範囲で MPPB を細胞増殖が進行した培養中盤に添加する手法をバッチ培養にて検討した (Table 4, Figure 23)。

Table 4 MPPB の添加プロトコル

Run	Day		
	0	2	4
MPPB (-)	0 mM	-	-
MPPB (+)-1	0.64 mM	-	-
MPPB (+)-2	0.32 mM	0.32 mM	-
MPPB (+)-3	-	-	0.64 mM

MPPB 200 mg/mL DMSO soln. (640 mM) を培養初日に 0.64 mM になるように添加した場合 (MPPB (+)-1)、培養初日は 0.32 mM になるように添加し更に培養 2 日目に初日添加分と合算して 0.64 mM になるようにした場合 (MPPB (+)-2)、培養 4 日目に 0.64 mM になるように添加した場合 (MPPB (+)-3)。

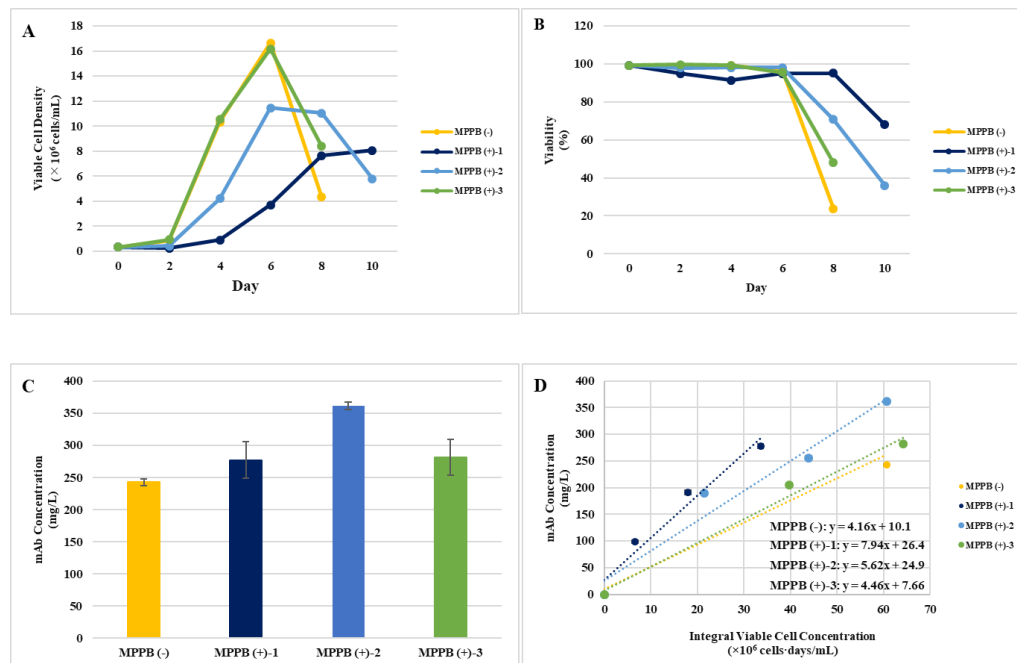


Figure 23 MPPB 添加方法の検討結果

Table 4 に示す MPPB 添加プロトコルで培養を行い生細胞密度 (A) および細胞生存率 (B) を 2 日ごとに測定し、細胞生存率が 70% 未満に達するまで細胞培養を続けた。また、IVCC に対する mAb 濃度 (C) の傾きから CSPR (D) を算出した<sup>37)</sup>。

mAb 濃度は、MPPB を添加しない場合 243 mg/L、MPPB を培養開始日のみに添加 (MPPB (+)-1) 場合 277 mg/L、培養開始日と培養 2 日目に添加 (MPPB (+)-2) した場合 362 mg/L、培養 4 日目に添加 (MPPB (+)-3) した場合 282 mg/L であり、培養開始日と培養 2 日目に分けて添加することで mAb 濃度が最も向上した (Figure 23C)。なお、いずれの場合も MPPB を添加しない場合よりは mAb 濃度は向上する結果であった。一方、MPPB による細胞増殖抑制は MPPB の添加日が遅くなるにつれて弱くなり、培養 4 日目に MPPB を添加した場合の VCD の推移は MPPB を非添加時と変わらず最大 VCD も培養 6 日目に各々  $16\text{--}17 \times 10^6$  cells/mL まで到達した (Figure 23A)。また、細胞生存率と CSPR も VCD と同様の傾向を示し MPPB の添加日が遅くなるほど MPPB による細胞生存率の維持効果が低くなり、CSPR の上昇効果も低くなった (Figure 23B and 23D)。

### 3.4 考察

短期間のバッチ培養による MPPB の特性解析の結果から、0.32 mM 未満の濃度の場合には細胞増殖ならびに CSPR のいずれの挙動もコントロールに対して 10%程度の変化に留まることが分かった。一方で、1.28 mM 以上の場合には細胞増殖がほぼ完全に抑制されると共に CSPR が 5 倍に到達するが、細胞生存率が低下した。即ち、MPPB による CSPR 向上の効果と細胞生存率の維持の観点から、MPPB の添加濃度は 0.32-0.64 mM 付近が最適と判断した。添加濃度の妥当性に関しては、同様の効果を持つ既知物については、塩化リチウム<sup>16)</sup>であれば 10 mM、酪酸<sup>17)</sup>ならば 5 mM、CCI<sup>23)</sup>であれば 0.005-0.010 mM と、MPPB の最適添加濃度 0.32-0.64 mM を挟んで 10 倍前後の濃度範囲で効果を示すことから、MPPB の添加濃度は妥当なものと判断した。また、0.32 mM MPPB 条件下で単位細胞あたりの MPPB の分子数を考慮すると、培養 4 日目の VCD  $6.0 \times 10^6$  cells/mL 時に単位細胞あたり  $3.2 \times 10^6$  個の過剰な MPPB 分子が必要であることから、MPPB は非触媒的に細胞に作用することが推定される。なお、実際に細胞に取り込まれた MPPB の分子数の定量調査は未実施のため今後の課題である。

一方、1 次および 2 次スクリーニングにおいては MPPB 添加により mAb 濃度が向上したが、スクリーニング時とは逆に特性解析時には MPPB を添加するにつれ mAb 濃度が低下する現象が見られた。MPPB の添加と共に細胞増殖が抑制され CSPR が増加するが、mAb 濃度は細胞密度と CSPR の積により決まるため何らかの理由で評価系の細胞密度と CSPR のバランスが実験間で変化したと推測された。特性解析時には、0.64 mM の MPPB 濃度においてはコントロールと比較して細胞増殖が 0.15 倍にまで抑制されるのに対して CSPR は向上したが 2.7 倍の増加率であった。即ち、細胞増殖の減少率に対して CSPR の増加率の方が小さく、その積が 0.41 を示すため、培養あたりの mAb 濃度は減少している(積が 1 の場合、コントロールと同じ mAb 濃度であることを示す。)。更に MPPB 1.28 mM ではコントロールに対し細胞増殖が 0.05 倍にまで抑制されるのに対し CSPR は 4.8 倍の増加率であり、その積は 0.24 となることから、MPPB 0.64 mM 時よりも一層 mAb 濃度が減少している(Figure 15D)。

mAb 濃度が実験間で再現されなかった原因を次のように考察する。スクリーニングに用いた静置培養時には、コントロールも MPPB 添加時にも共に細胞増殖が低調であり、また、コントロールと MPPB 添加時の VCD の差は小さく MPPB 添加時の相対的な細胞増殖率は 0.9 倍に留まった。しかし、特性解析に用いた振盪培養時には、コントロール条件の細胞増殖が静置培養時より高く、MPPB の添加の有無による VCD の差が広がり、MPPB 添加時の相対的な細胞増殖率はコントロールに対して 0.6 倍となった。一方、MPPB 添加による CSPR の上昇倍率は静置培養では 2.0 倍、振盪培養では 1.4 倍であった。即ち、静置培養条件下では、コントロール条件と MPPB 添加時とで同程度の増殖性であったために MPPB 添加による CSPR の向上効果により MPPB 添加時の mAb 濃度がコントロール条件よりも増加した。対照的に、振盪培養の条件下では、コントロール条件の細胞増殖が著しく高い反面 MPPB 添加による増殖抑制が強く現れ、その効果が MPPB 添加による CSPR の向上効果を上回ったために MPPB 添加時の mAb 濃度が低い結果となった (Figure 12 and 15)。なお、溶存酸素濃度の低下が細胞増殖を制限することは古くから知られていることから<sup>44)</sup>、静置培養時には振盪培養時よりも酸素供給速度が低く溶存酸素が低くなるため、本来細胞増殖が活発なコントロール条件においても細胞増殖が抑制されたと推測される。また、この増殖抑制下では MPPB による細胞増殖抑制の効果が低下したと解釈した。

続いて、MPPB が rCHO 細胞の mAb の CSPR を増加させる理由を探るため、Becker、Kondo および Hara による目的タンパク質の発現量と細胞内 ATP 量は相関するとの報告<sup>35, 36)</sup>に基づき、細胞内 ATP 量に対する MPPB の濃度の影響を調査した。その結果、MPPB 濃度を 0.16 mM から 0.64 mM まで増加させるにつれて CSPR が向上すると共に細胞内 ATP 量が増加し、さらには単位細胞あたりのグルコース消費量も増加することが分かった (Figure 16)。細胞内 ATP 量の増加は、Becker や Kondo および Hara らの報告から予期されたことであるが、単位細胞あたりのグルコース消費量が増加する結果は予期しておらず興味深い結果であった。なお、インスリンが CHO 細胞においても GLUT4 を刺激<sup>45)</sup>し細胞あたりのグルコース消費量を向上させることは知られているが、MPPB の様な非ペプチド性の低分子化合物が単位細胞あたりのグルコース消費量を向上させると報告している例は知られていない。現段階では MPPB が単位細胞あたりのグルコース消費量を増加さ



せる明確な理由は不明である。また、Mulukutla<sup>46)</sup>らが報告しているように動物細胞は増殖に 30% 近くの ATP を活用していること、Tempeton<sup>47)</sup>らが報告しているように安定期の細胞が TCA 回路<sup>48, 49)</sup>を活性化させ単位細胞あたりのグルコース消費量を向上させる報告を考慮すると、MPPB による細胞増殖抑制効果もまた細胞内 ATP 量の増加に寄与していると推定される。以上のことから、MPPB は、細胞増殖を抑制すると共に単位細胞あたりのグルコースの消費量を向上させ細胞内 ATP 量を向上させる効果を有し、その結果 mAb 生産に使用できる ATP が増加し CSPR を向上させたと推定される。

mAb の生産を調節する既存の化合物は、細胞周期を変化させることが知られている。そこで、rCHO 細胞に 0.64 mM の MPPB を添加して細胞周期の変化を観察した。その結果、Fig.17 に示すように MPPB は細胞周期を G2/M に偏らせる性質を有することが分かった。G2/M に細胞周期を偏らせ、かつ、CSPR を向上させる既報の化学物質は今回発見した MPPB の他には塩化リチウムのみである。G2/M に細胞周期を留める化合物はアポトーシスを誘導<sup>50, 51)</sup>することが知られており、なお、MPPB においても 1.28 mM 以上の濃度では細胞生存率が低下し始めるため高濃度条件下ではアポトーシスを誘導している可能性がある。細胞周期の抑制や生産性向上の点で同様の効果を示す塩化リチウムとの比較実験の結果を第五章で述べる。

続いて、特性解析で得られた MPPB の 3 つの特性、すなわち細胞増殖抑制と単位細胞あたりのグルコース消費量の増加ならびに CSPR 向上効果について、長期培養においてどのように推移するかをバッチならびにフェドバッチ培養で検討した。その結果、バッチ培養とフェドバッチ培養双方において全ての特性が反映される知見が得られた (Figures 18-21)。更に、MPPB を添加することでバッチ培養、フェドバッチ培養双方において細胞生存期間が延長 (バッチ培養時 8→10 日、フェドバッチ培養時 10→14 日) する予期せぬ知見が得られたと共に、細胞生存期間が延長することで mAb 濃度が MPPB 非添加時よりも向上する結果となった (グルコースを維持したフェドバッチ培養条件は除く)。

グルコースを維持しないフェドバッチ培養の MPPB 非添加条件においては一見エネルギー源であるグルコースの枯渇と共に細胞生存率が低下した様に見えるが、グルコースを維持したフェドバッチ

チ培養の MPPB 非添加条件においてはグルコースが枯渇しないにも拘らず細胞生存率が低下したことから単純にグルコースが枯渇したために細胞生存率が低下したわけではなく未検出の培地成分が枯渇している可能性が考えられた。一方、MPPB 添加条件においてはグルコース濃度の傾向に拘らず細胞生存率は MPPB 非添加条件よりも長く維持することが可能であった。この理由は MPPB の添加により VCD が抑制されたことで細胞生存率に影響する未検出の培地成分の枯渇時期を延長できたためと推定される。この細胞生存率の維持効果のため、特筆すべきことに、一般的に栄養素が豊富になり細胞生存率の維持により長期培養を行いやすいフェドバッチ培養と同じ培養期間をバッチ培養条件下で維持することができた (Figures 18 and 20)。

一方、mAb 濃度については、グルコースを維持したフェドバッチ培養を除いて、MPPB 添加時に VCD が 0.7 倍程度にも拘らず向上する結果となった。この理由は、先述したように、MPPB 添加により CSPR はバッチ培養時には 1.9 倍になり、グルコースを維持しないフェドバッチ培養時でも 1.5 倍となり、最終的な VCD と CSPR の積が 1 より高くなったためである。バッチ培養に対しフェドバッチ培養において CSPR の増加倍率が低下している理由は 2 点考察される。一つは、フェドバッチにおいては VCD がバッチ培養よりも 1.4 倍程度増加するため、単位細胞あたりの MPPB 濃度が相対的に減少し MPPB の効果が低下したことが推定される。もう一つは、バッチ培養よりもフェドバッチ培養は 4 日程度培養期間が延長されたため、MPPB の分解や付着などの原因により MPPB 濃度が減衰し効果が弱まったことが推定される。なお、バッチ培養とグルコースを維持しないフェドバッチ培養の CSPR を絶対値で比較すると、バッチ培養では MPPB 非添加、添加時に各々 4.16 pg/cell/day、7.94 pg/cell/day に対しグルコースを維持しないフェドバッチ培養では各々 7.07 pg/cell/day、10.5 pg/cell/day であり、バッチ培養からグルコースを維持しないフェドバッチ培養間に移行した際の CSPR の増加倍率は各々 1.7 倍と 1.3 倍であった (Figures 19 and 21)。即ち培養方法による CSPR の増加倍率は MPPB を添加しない場合の方が大きいことを意味する。筆者は、バイオ医薬品の培養プロセス開発業務に携わるため、その中で rCHO 細胞固有の CSPR の上限を上げることは難しいことを経験している。これを考慮すると、MPPB 添加をされた rCHO 細胞の CSPR はすでに上限近くまで上昇していたため、培養方法の変更による CSPR の向上率が低かったのではないかと

推察する。なお、グルコースを維持したフェドバッチ培養においては、MPPB を添加することで CSPR は 1.2 倍 (7.54→8.79 pg/cell/day) 上昇するが、その上昇率はグルコースを維持しないフェドバッチ培養の 1.5 倍 (7.07→10.5 pg/cell/day) より低い。この条件でのみ MPPB の添加にも拘らず MPPB を添加しない場合よりも mAb 濃度が低下した理由は不明である (Figure 21)。

MPPB の添加のタイミングは rCHO 細胞の増殖速度に大きく影響を与え、添加タイミングが早くとも遅くとも MPPB 添加による mAb 濃度向上の効果を最大化できないことが分かった (Table 4, Figure 23)。即ち、前述したように mAb 濃度は細胞濃度と CSPR の積であるため、細胞がある程度増殖して CSPR も向上するような濃度とタイミングで MPPB を添加するのが良いと考えられる。また、細胞増殖と CSPR はトレードオフの関係 (Figures 23A and 23D) にあるため、培養初日と培養 2 日目に MPPB を分割添加する手法により細胞増殖の抑制と CSPR の上昇が最適化され mAb 濃度が 1.5 倍に向上した (Figure 23C)。なお、細胞生存率は細胞密度と完全に負の相関があり、細胞増殖が抑制されるほど細胞生存率が長期にわたって維持される傾向がある。この傾向は、バッチ培養やフェドバッチ培養時と変わらないため、培養方法の違いの影響はないことが分かる。

また、グルコースを維持しないフェドバッチ培養においては、MPPB の添加は生産される mAb の糖鎖の N 型糖鎖の種類の内訳 (プロファイル) に影響を与え、ガラクトシル化を抑制する結果となった。mAb がガラクトシル化された N 型糖鎖を持つと補体依存性細胞傷害<sup>39, 40)</sup>および抗体依存性細胞傷害<sup>41-43)</sup>に影響を与えるため、mAb 上の N 型糖鎖のガラクトシル化率は、医薬品開発の観点から mAb の重要な品質特性の 1 つとなっている。従って mAb の活性調整や一貫した品質を維持するために、ガラクトシル化は製薬プロセスの研究開発中にしばしば制御対象となっている。幾つかの培地添加物は rCHO 細胞における mAb のガラクトシル化に影響を与えることが知られており、たとえば吉草酸、バルプロ酸、CDK4/6 阻害剤、ガラクトース、マンガン、およびウリジンはガラクトシル化を促進し<sup>18, 19, 23, 52, 53)</sup>、亜鉛とアンモニアはガラクトシル化を抑制することが知られている<sup>54, 55)</sup>。しかし、ガラクトシル化抑制効果を示す化合物の数は少なく、培地添加物によるガラクトシル化の抑制は多くは知られていない。そのため MPPB がガラクトシル化を抑制した結果は、mAb の N 型糖鎖を制御するための新しいオプションになる可能性がある。なお、MPPB がガラクトシル化を抑制する機序は不

明であるが、MPPBはその骨格にスクシンイミドやヒドラジドを有し細胞内の還元反応や加水分解反応によりアンモニアを生じる可能性があることから、MPPBの分解による細胞内アンモニア濃度の向上によりガラクトシル化が抑制されている可能性がある。

### 3.5 小括

rCHO 細胞の mAb 生産性を向上させる MPPB の有効濃度は 0.32-0.64 mM である。従来の rCHO 細胞の生産性を向上させる化合物と同様に、MPPB は rCHO 細胞の増殖を抑制する。一方、MPPB は従来の化合物では報告されていない単位細胞あたりのグルコース消費量を向上させる効果を有すると共に細胞内 ATP 量を増加させる。さらに、細胞周期に影響し G2/M に偏らせる作用を持つ。文献情報を加味するとグルコース消費量の向上と細胞増殖抑制の 2 つの効果により細胞内 ATP ならびに CSPR を向上させる化合物であることが推定された。なお、CSPR を高める作用と細胞周期を G2/M に偏らせる作用は既報の塩化リチウムと同様であることから比較実験の結果を第五章で述べる。また、MPPB は、報告例の少ない N 型糖鎖の Gal 化を低減させる効果を有することから、mAb の N 型糖鎖を制御する手法の選択肢になる可能性がある。

長期間のバッチ培養においても MPPB の添加は細胞増殖を抑制すると共に単位細胞あたりのグルコース消費量と CSPR を向上させた。更に短期間の培養時には得られなかった知見として、細胞生存率を維持することで培養日数を延長し mAb 濃度を向上させると分かった。なお、グルコース濃度を維持しないフェドバッチ培養での MPPB 添加時の特性はバッチ培養時と同じであるが、グルコース濃度を維持した培養下では MPPB 添加時の CSPR の増加量は非添加時に比べて小さくなった。グルコース濃度を維持した場合の CSPR 向上率低下の原因は不明であり、MPPB の作用機序に関しては更なる究明が必要である。

#### 4. MPPB の構造活性相関と培養による活性部位の評価

第四章では、rCHO 細胞の mAb 生産において C SPR や mAb 濃度を向上させる活性が MPPB より高い化合物を探索することを目的として MPPB の構造活性相関を検討した結果を述べる。バッチ培養による構造活性相関の結果、MPPB の部分構造である 2,5-DP が MPPB の活性部位であることを見出した。また 2,5-DP と C SPR との構造活性相関を評価し、類縁のアルキルピロール類の中では細胞生存率を維持しつつ C SPR を最も向上させる化合物は 2,5-DP であることを明らかにした。更に、2,5-DP をバッチ、フェドバッチ培養で評価した。

第四章一節(4.1.)では、MPPB の活性中心が 2,5-DP であることを見出した経緯と 2,5-DP の類縁化合物と C SPR との構造活性相関を評価した結果を述べる。第四章二節(4.2.)では 2,5-DP のバッチ培養、フェドバッチ培養で評価した結果を述べる。

##### 4.1 MPPB の活性部位の探索と活性部位の構造活性相関

バッチ培養により MPPB の 5 つの部分構造が C SPR に与える影響を評価した (Figure 24)。各々の化学構造は *N*-(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)ベンズアミド (**3**)、4-(2,5-ジメチル-1*H*-ピロール-1-イル)ベンズアミド (**4**)、スクシンイミド (**5**)、4-アミノベンズアミド (**6**) および 2,5-DP (**7**) であり、すべての化合物の濃度が 0.32 mM になるように調整しバッチ培養にて C SPR を評価した (Figure 25)。

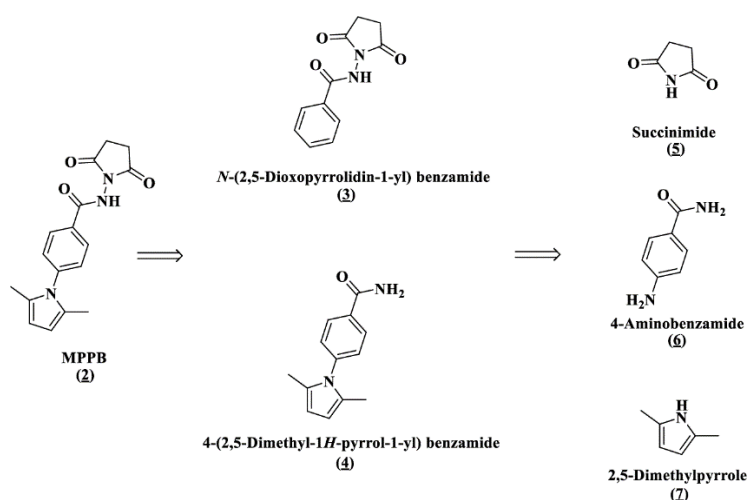


Figure 24 活性部位を調査するために用いた MPPB の部分構造

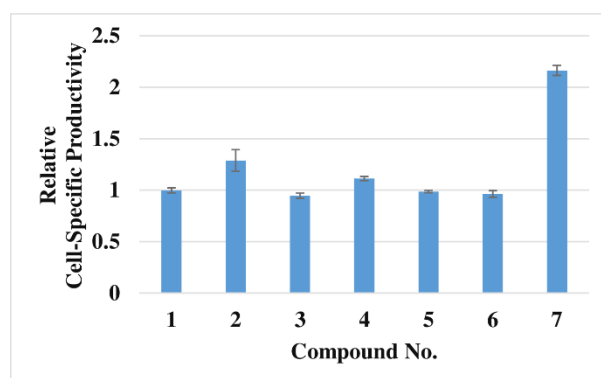


Figure 25 MPPB の部分構造による CSPR への影響

各化合物が 0.32 mM になるように培養初日に添加し、培養 3 日目に CSPR を評価した。

列1:ジメチルスルホキシド(コントロール)、列2:MPPB、列3:*N*-(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)ベンズアミド、列4:4-(2,5-ジメチル-1*H*-ピロール-1-イル)ベンズアミド、列5:スクシンイミド、列6:4-アミノベンズアミド、列7:2,5-DP。

MPPB の部分構造の中で最も CSPR を向上させた化合物は、2,5-DP (7) であり、MPPB (2) がコントロールに対し CSPR を 1.3 倍に高めたのに対し 2,5-DP (7) は CSPR を 2.2 倍に高めた。また、2,5-DP を含有する 4-(2,5-ジメチル-1*H*-ピロール-1-イル)ベンズアミド(4)も僅かに CSPR を向上

(1.1 倍)させた。続いて MPPB の活性中心である 2,5-DP の構造活性相関を評価した (Figures 26 and Table 5)。

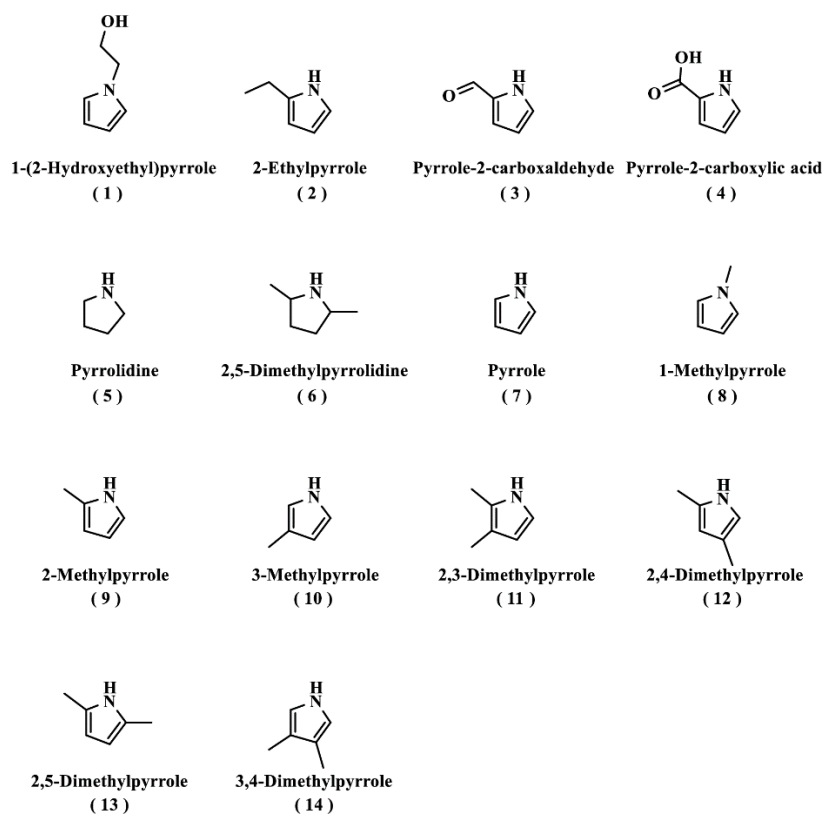


Figure 26 2,5-DP の活性構造相関評価に用いたアルキルピロール誘導体



Table 5 2,5-DP の構造活性相関

Compound No.	Compound name	Viability (%)	Relative cell-specific productivity
-	Dimethyl sulfoxide (control)	99.4 (0.4)	1.0 (0.0)
-	MPPB	99.2 (0.5)	1.4 (0.2)
<b>1</b>	1-(2-Hydroxyethyl)pyrrole	99.6 (0.2)	1.0 (0.1)
<b>2</b>	2-Ethylpyrrole	41.2 (2.5)	1.4 (0.1)
<b>3</b>	Pyrrole-2-carboxaldehyde	99.3 (0.2)	1.0 (0.1)
<b>4</b>	Pyrrole-2-carboxylic acid	99.5 (0.2)	1.0 (0.1)
<b>5</b>	Pyrrolidine	98.9 (1.4)	1.0 (0.0)
<b>6</b>	2,5-Dimethylpyrrolidine	99.0 (1.0)	1.0 (0.0)
<b>7</b>	Pyrrole	99.3 (0.7)	1.0 (0.1)
<b>8</b>	1-Methylpyrrole	99.4 (0.1)	1.0 (0.1)
<b>9</b>	2-Methylpyrrole	50.2 (0.2)	3.0 (0.2)
<b>10</b>	3-Methylpyrrole	34.4 (2.0)	4.0 (0.2)
<b>11</b>	2,3-Dimethylpyrrole	2.6 (1.7)	7.8 (0.4)
<b>12</b>	2,4-Dimethylpyrrole	30.7 (3.4)	4.8 (0.3)
<b>13</b>	2,5-Dimethylpyrrole	97.9 (0.6)	2.2 (0.0)
<b>14</b>	3,4-Dimethylpyrrole	4.0 (1.2)	7.4 (0.3)

各々のピロール化合物を培養初日に 0.32 mM の濃度になるように添加し 3 日間培養後、細胞生存率とコントロール(DMSO)に対する CSPR を評価した。括弧内の数値は標準偏差を意味する。

アルキルピロール誘導体 (**2, 9-14**) は、コントロール条件よりも CSPR を 1.4~7.8 倍向上させる効果を示したが、ピロール (**7**) ならびに 1-アルキルピロール (**1, 8**) は CSPR を全く向上させなかった。

一方、2,5-DP (**13**)を除いて、アルキルピロール誘導体(**2, 9-14**)では生存率が50%未満に低下した。2,5-DP (**13**)の還元体であり炭素骨格が近似している2,5-ジメチルピロリジン(**6**)も細胞培養に全く影響を与えなかった。

続いてCSPRを向上させたアルキルピロール誘導体(**9-14**)の他の濃度におけるCSPRの向上具合と細胞生存率を評価した結果を示す(Figure 27)。

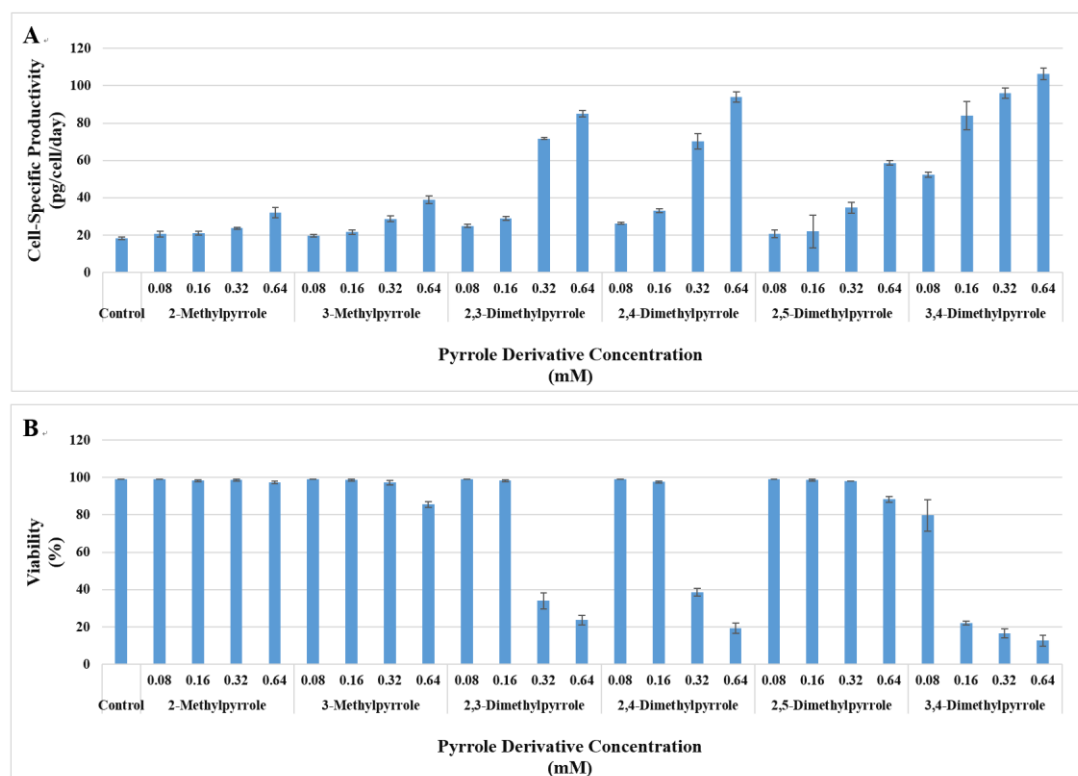


Figure 27 アルキルピロール誘導体の rCHO 細胞への影響評価

0.08-0.64 mM の範囲でアルキルピロール誘導体の濃度を変動させ、培養 3 日目の時点の細胞生存率(A)とCSPR(B)を評価した。培養 3 日目に80%以上の細胞生存率を維持した場合、化合物によって細胞死が誘導されなかったと判断した。

評価の結果、細胞死を誘導しなかった化合物は2-メチルピロール、3-メチルピロール、2,5-DPの3化合物であった。2-メチルピロール、3-メチルピロールによるCSPRの向上効果は最大濃度である

0.64 mM で 1.5-2.0 倍であり、同濃度での 2,5-DP による CSPR の向上効果は 3.0 倍であった。本結果から 2,5-DP は、細胞生存率を維持しながら CSPR を高める最も効果的なアルキルピロール誘導体であると判明した。

## 4.2 2,5-DP の rCHO 細胞培養への影響評価

### 4.2.1 2,5-DP 共存下でのバッチ培養における長期培養の結果

2,5-DP の添加濃度ならびに適切な添加方法をバッチ培養により評価した。第三章三節(3.3.)で述べた MPPB の評価と同様に 2,5-DP を培養初日に添加した場合と培養 4 日目に添加した場合の 2 パターンで実施し細胞生存率が 70%を下回った時点を経験した培養の終点とした (Figure 28)。また、MPPB と同様に培養時のグルコースとラクテートの各々の濃度の推移を評価した (Figure 29)。

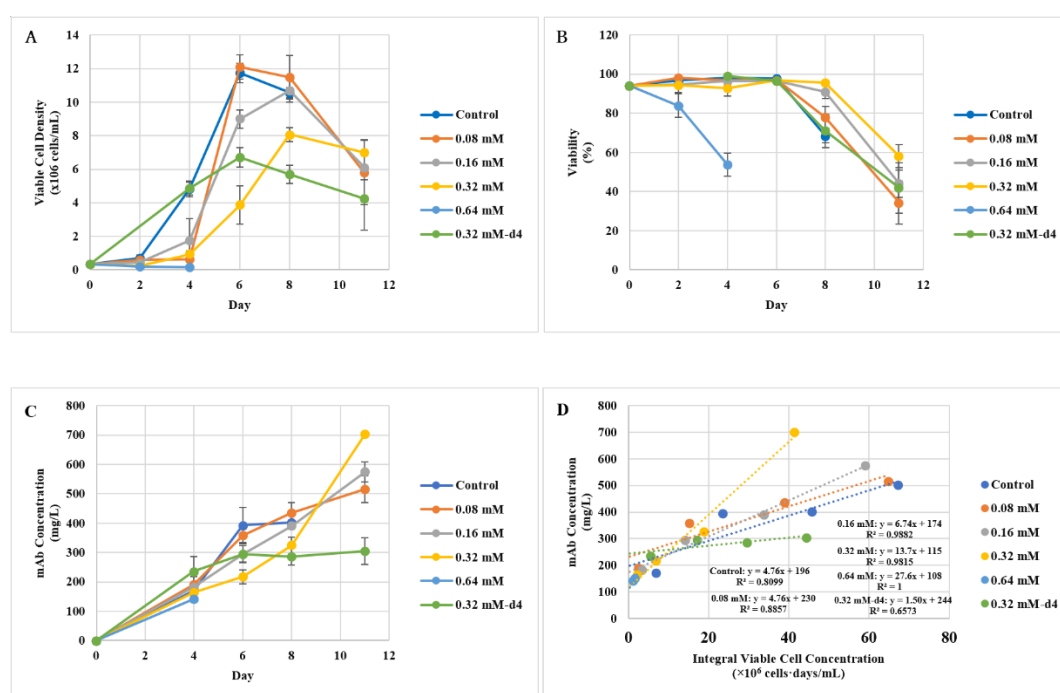
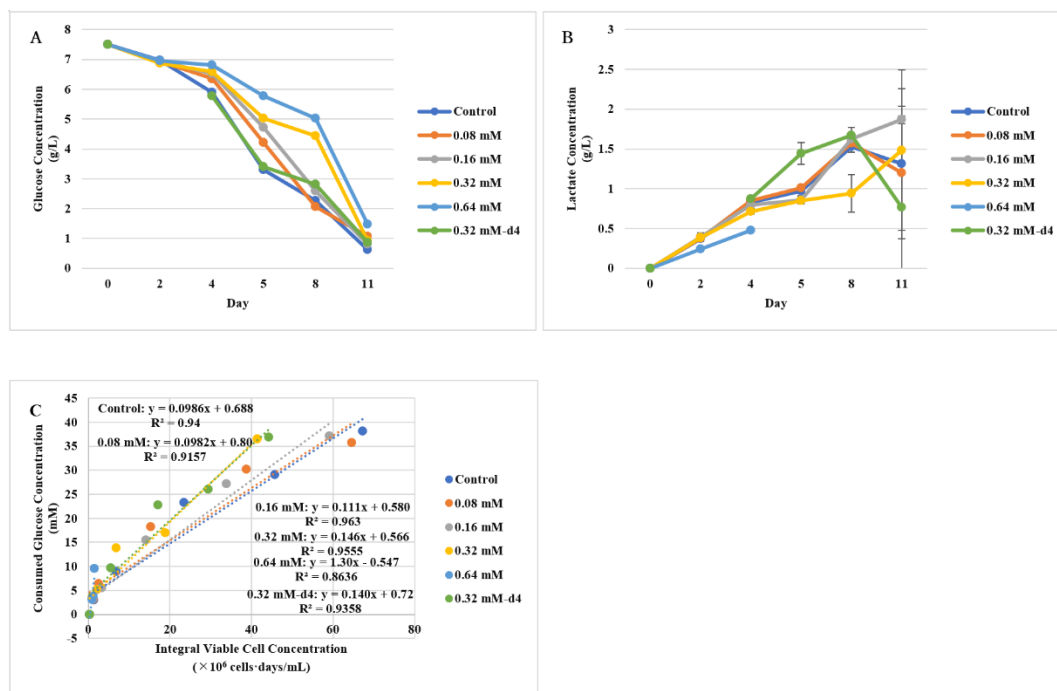


Figure 28 2,5-DP 共存下バッチ培養における長期培養の評価 (1/2)

2,5-DP を 0.08-0.64 mM の濃度で培養初日に添加し、細胞生存率が 70%未満になるまで培養を継続し VCD(A)、細胞生存率(B)、mAb 濃度(C)を測定した。また、IVCC に対する mAb 濃度の傾きから CSPR(D)を算出した<sup>37)</sup>。更に 2,5-DP を培養途中に添加する影響を評価するために培養 4 日目に 2,5-DP を 0.32 mM の濃度で添加し同様に評価した。

Figure 29 2,5-DP のバッチ培養における代謝プロファイル



培養中のグルコースの濃度(A)、ラクテートの濃度(B)を測定し、IVCC に対する消費グルコース濃度の傾きから単位細胞あたりのグルコース消費量(C)を算出した<sup>37)</sup>。

2,5-DP の添加濃度を 0.08 mM から上昇させることで到達 VCD が低くなる半面、mAb 濃度が高くなり 0.32 mM の濃度で最大の 702 mg/L に到達した(Figure 28A and 28C)。また、細胞生存率も 0.08 mM から 0.32 mM までは向上し培養期間はいずれも 11 日目まで到達した(Figure 28 B)。一方、2,5-DP を添加しないコントロール条件では、培養 8 日目には細胞生存率が 70%を下回り mAb 濃度は 400 mg/L であった。0.64 mM の濃度では VCD は全く増加せず、細胞生存率も培養 4 日目には 70%を下回る結果となり mAb 濃度も 142 mg/L であった。なお、培養 4 日目に 2,5-DP を添加した場合、添加直後から VCD の増加が抑制されると共に mAb の産生は停止し培養 6 日目から培養最終日の 11 日目まで 300 mg/L 前後を維持した。CSPR は 0.16-0.64 mM の濃度までは 2,5-DP の添加と共に増加しコントロール条件よりも高くなるが、0.08 mM の濃度下では全く増加しなかった。更に培養 4 日目に 2,5-DP を添加した場合には mAb の産生が停止するため CSPR はコントロール条件よりも低くなった(Figure 28 D)。

グルコース濃度は 2,5-DP の添加濃度に拘らず培養 11 日目には 7.5 g/L から 1 g/L 前後まで減少した (Figure 29A)。ラクテート濃度はいずれの濃度においても 2 g/L 以上は蓄積しなかったが、0.32 mM 以上の 2,5-DP の濃度では蓄積濃度が減少し 1 g/L を下回る結果となった (Figure 29B)。また、2,5-DP は MPPB と同様に添加濃度と単位細胞あたりのグルコース消費量が正の相関を示した (Figure 29C)。

#### 4.2.2 2,5-DP 共存下でのフェドバッチ培養における長期培養の結果

バッチ培養で最も高い mAb 濃度を示した 0.32 mM の 2,5-DP 濃度でフェドバッチ培養時を実施し 2,5-DP が培養に与える影響を評価した (Figures 30, 31)。

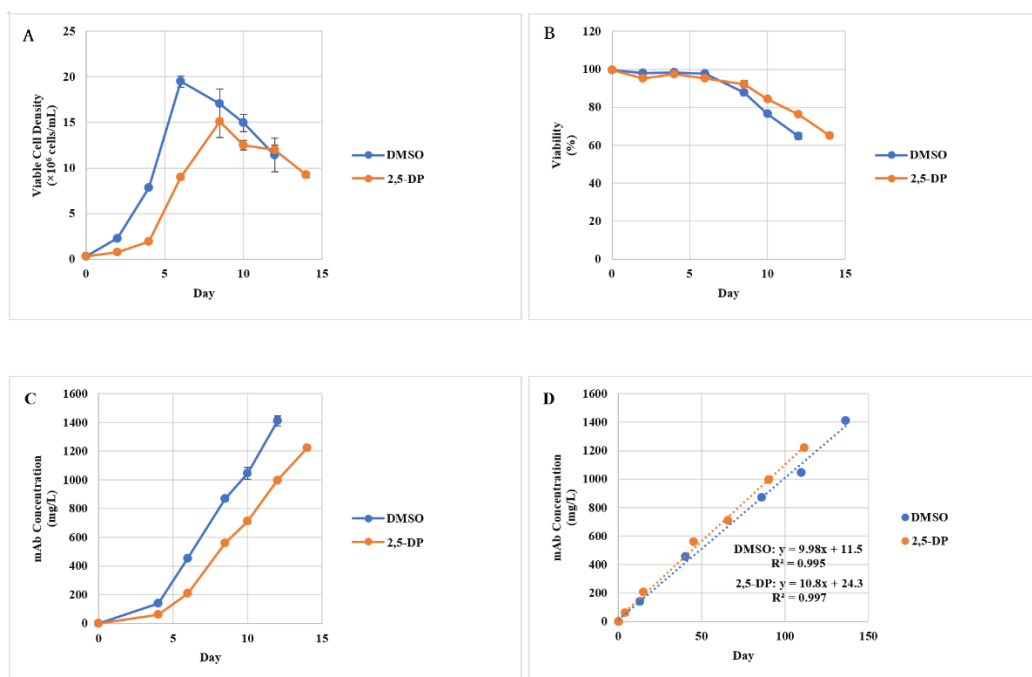


Figure 30 2,5-DP 共存下フェドバッチ培養における長期培養の評価 (1/2)

2,5-DP を 0.32 mM の濃度で培養初日に添加し、細胞生存率が 70%未満になるまで培養を継続し VCD(A)、細胞生存率(B)、mAb 濃度(C)を測定した。また、IVCC に対する mAb 濃度の傾きから CSPR(D)を算出した<sup>37)</sup>。

MPPB と同様にフェドバッチにおいても 2,5-DP を添加することにより VCD は抑制され最大到達 VCD はコントロールの  $20 \times 10^6$  cells/mL から  $15 \times 10^6$  cells/mL まで低下した (Figure 30A)。また細胞生存率は 2,5-DP の添加により維持され、コントロールが培養 12 日目まで 70%を下回ったのに対し 2,5-DP 添加時には培養 14 日目まで維持した (Figure 30B)。一方、mAb 濃度は MPPB の場合と異なり 2,5-DP を添加することにより低下し、コントロールが 1411 mg/L であるのに対し 1221 mg/L であった (Figure 30C)。mAb 濃度が低下したことから予想されるように 2,5-DP 添加による

CSPR の顕著な上昇は見られず、9.98 pg/cell/day から 10.8 pg/cell/day の上昇に留まった (Figure 30D)。

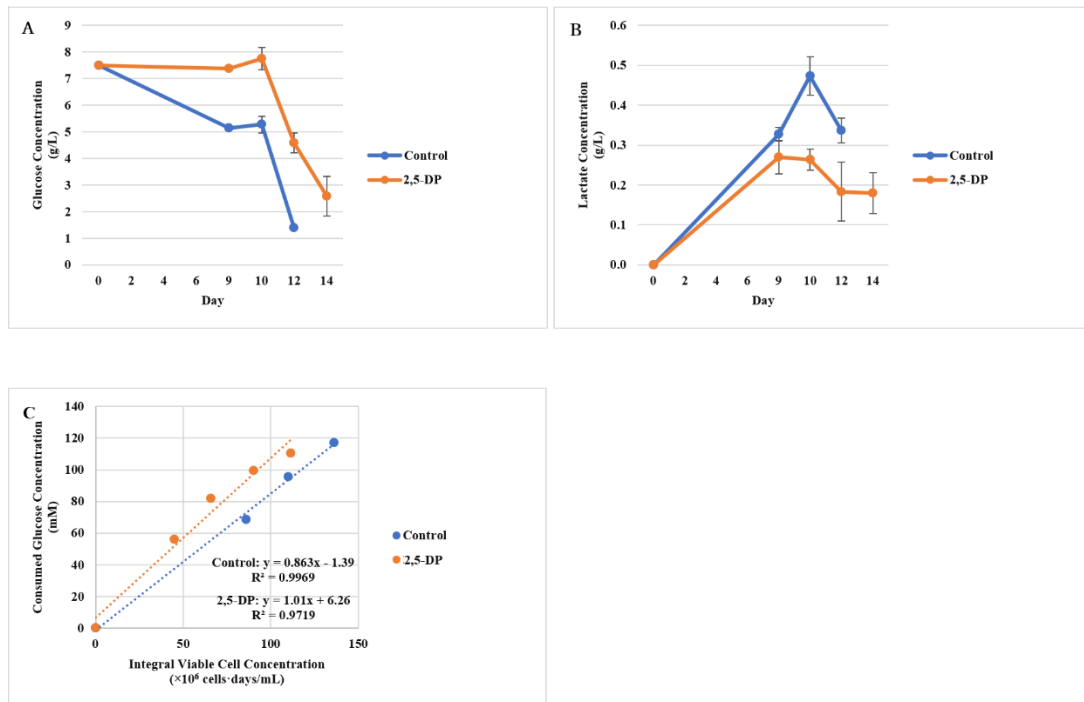


Figure 31 2,5-DP 共存下フェドバッチ培養における長期培養の評価 (2/2)

培養中のグルコースの濃度 (A)、ラクテートの濃度 (B) を測定し、IVCC に対する消費グルコース濃度の傾きから単位細胞あたりのグルコース消費量 (C) を算出した<sup>37)</sup>。なお、培養 2,4,8 日目 2% (v/v) のフィードを行うと共に、培養 8 日目にはグルコース濃度を維持するために 5 g/L のグルコースを添加した。

2,5-DP 添加時には VCD が低下するためグルコース濃度は高く推移する (Figure 31A)。しかし、単位細胞あたりのグルコース消費量は 2,5-DP 添加時に 0.963 pmol/cell/day から 1.01 pmol/cell/day へと僅かな向上が見られた。また、ラクテートの蓄積は 2,5-DP の添加時に抑制される傾向が見られた (Figure 31B)。



### 4.3 考察

CSPR を向上させる MPPB の特性の由来となる化学構造を探索するために MPPB を 5 つの部分構造に分割し細胞増殖と CSPR への影響を評価した。その結果、最も顕著に CSPR を向上させた化合物は 2,5-DP であり、2,5-DP の窒素部位が修飾されている MPPB や 4-(2,5-ジメチル-1*H*-ピロール-1-イル)ベンズアミドは相対的に活性が低下した。従って、窒素部位が修飾されていないことが CSPR を顕著に向上させるための条件の1つであることが本実験から分かった (Figures 24 and 25)。また、5 つの部分構造の内、スクシンイミドや 4-アミノベンズアミドは、化学構造上各々 TCA 回路の中間化合物であるコハク酸<sup>56, 57)</sup>や核酸合成時のホルミル化に使用される葉酸の前駆体である 4-アミノ安息香酸<sup>58)</sup>に変換される可能性があり、当初何らかの影響が生じると予想された。しかし、これらの化合物は予想に反して全く rCHO 細胞に影響を及ぼさなかった。従って、MPPB の活性は 2,5-DP 部位のみによってもたらされることが明確となった。一方、2,5-DP のピロール骨格は細胞内では電子伝達や薬物代謝酵素などのヘムタンパク質の補欠分子であるヘム(ポルフィリン骨格含有)<sup>59, 60)</sup>の部分構造であるため、先述した MPPB や第 4 章述べる 2,5-DP による ATP の向上を考慮すると、現時点では推定に過ぎないが、2,5-DP は電子伝達系のヘムに関連しているかも知れない。

次に、2,5-DP の化学構造と CSPR との構造活性相関を解明し更に生産性の向上に繋がる化合物を見出すために 2,5-DP の類縁物と CSPR ならびに細胞生存率の関係を調査した。その結果、必須な構造因子が明らかになった。2,5-DP の芳香環の還元体である 2,5-ジメチルピロリジン<sup>59)</sup>は全く活性を示さないことから、活性を示すためには芳香環の存在は必須である (Table 5)。更に炭素上にアルキル基が置換していないピロールやピロールの 1 位がアルキル基で修飾された化合物は活性を示さない。一方、ピロールの炭素骨格が 1 カ所でもアルキル化されたアルキルピロール類はすべて CSPR を向上させたことから、活性を示すためにはピロールの芳香環に加えてピロールの炭素骨格がアルキル基により修飾されることが必須条件であることが明らかになった。また、CSPR と細胞生存率はピロールのアルキル化される位置に大きく依存し、傾向として一置換ピロール場合は 2 位のアルキル化よりも 3 位のアルキル化により CSPR は顕著に向上するが、その反面細胞生存率も顕著に低下することがわかった。また、興味深いことに、ジアルキル置換ピロールのアルキル置換の位置が変

化すると細胞生存率と CSPR の関係に大きな違いをもたらした。即ち、ピロールが対称にアルキル置換されて 2 位と 5 位がジ置換体になる場合、CSPR の向上は抑制されたが細胞生存率は向上した。一方、同様に対称に 3 位と 4 位がジ置換体になると CSPR は約 2 倍に向上するが細胞生存率が急激に低下した。更に非対称にアルキル置換された 2,3-ジメチルピロールの場合、3 位のアルキル化に加え CSPR 向上効果が弱い 2 位がアルキル化されているにも拘らず、CSPR 向上効果が強い 3, 4 位が両方メチル化されている場合と同様の CSPR 向上効果を示した。しかし、非対称に 2 位と 4 位がメチル化された 2,4-ジメチルピロールにおいては 3,4-ジメチルピロールほどの CSPR の顕著な向上は見られなかった。以上のことから CSPR を向上させる要因を考察する。ピロールのアルキル置換が CSPR の向上に寄与する事実については、当初は芳香環の電子密度が重要なのではないかと予想していた。しかし、ピロールの窒素上の孤立電子対の芳香環への電子の押し込みを向上させる 1 位のアルキル置換は全く影響しないことからピロールの電子密度は CSPR の向上に寄与していないと推測された。また、2 つのアルキル基が離れてピロールを修飾している場合には CSPR の向上効果が最大化せず、2,3-ジメチルピロールや 3,4-ジメチルピロールのようにアルキル基が隣接してピロールを修飾している場合に CSPR が最大化されることを考慮すると、ピロールを対称的にアルキル基が修飾することが重要なのではなく、アルキル基が  $\alpha$ 、 $\beta$  の関係 (1,2 の関係) でピロールを修飾する化学構造こそが CSPR の向上に重要であると推定される。2 番目に CSPR が高くなる 2,4-ジメチルピロールと 2,5-DP についても同様の考察をすることができ、これらの場合もピロールを対称的にアルキル基で修飾することが重要なのではなく、アルキル基が  $\alpha$ 、 $\gamma$  の位置関係 (1,3 の関係) で修飾することが CSPR を高める化学構造であることが推定される。一方、細胞生存率に関しては、先述したようにアルキル化される位置が重要であり 3, 4 位の置換を含まない化学構造が細胞生存率を向上させるためには必要である。即ち、細胞生存率を維持しながら CSPR を向上させるためには芳香環を有し、 $\alpha$  と  $\gamma$  の位置関係でアルキル化されており、3 位ならびに 4 位がアルキル化されていない化学構造を有する化合物、即ち 2,5-DP が細胞培養に添加する化合物として適していたと解釈される。

2,5-DP をバッチ培養で評価した結果、MPPB と同様に 2,5-DP の添加によりコントロールよりも VCD が抑制されると共に細胞生存率が維持され結果として培養期間が 8 日から 11 日まで延長した

(Figure 28A and 28B)。更に 0.32 mM の濃度で最も C SPR が高くなると共に mAb 濃度も最大化されコントロールよりも高い結果となった (Figure 28C and 28D)。ここまでは MPPB と全く同じ効果であり、2,5-DP が MPPB の活性中心であることから容易に予想され得る結果であった。しかし、第三章三節(3.3.)に記載したように MPPB が培養 4 日目に添加することで僅かながらも C SPR と mAb 濃度を向上させたにも拘らず、2,5-DP の場合には抗体の産生を殆ど停止した結果は完全に予想外であり、原因は不明である。同濃度の 2,5-DP を培養初日に添加した場合には最終的に mAb 濃度が高くなるなど正の効果が強いことから、2,5-DP の添加濃度が不適切とは考えられず、現象論として細胞増殖中に添加するプロトコルが悪影響を与えたと推定される。代謝面では、培養 4 日目に 2,5-DP を添加した場合、4 日目以降はコントロールの半分の VCD にもかかわらずグルコース濃度は同じ推移であることから、単位細胞当たりのグルコース消費量が 2 倍近く伸びていることがわかる。一方、ラクテートの濃度はコントロールや他の条件よりも 0.5 g/L 程高くなっていることから、2,5-DP の添加により急に向上したグルコース消費に細胞の代謝が追い付いていないのではないかと推測した。

2,5-DP をフェドバッチ培養で評価した結果、MPPB 同様に VCD の抑制ならびに細胞生存率の維持による培養期間の延長がみられたが、mAb 濃度はコントロールを下回り、C SPR の上昇率も 10%程度に留まった (Figure 29C)。代謝傾向を見ると 2,5-DP の添加により単位細胞当たりのグルコースの消費量は 20%程度上がっておりラクテートの蓄積濃度も低下していることから培養状態は良いと考えられる (Figure 29 A and 29B)。本検討ではグルコースの別添によりグルコース濃度を維持しているため、MPPB の共存下のフェドバッチ培養でグルコース濃度を維持した場合 (Figure 20) と同様に、2,5-DP の添加の影響が減少したと推定される。この原因については現在不明である。

以上のことから、2,5-DP は MPPB よりも C SPR を向上させるなどの利点がある一方で、MPPB と異なり、培養途中に添加することで mAb の産生を低下させるなどの現象がみられたため、制御が難しい化合物であることが示唆された。MPPB と 2,5-DP の化学構造上の差は 2,5-DP の窒素原子が他の化学構造により修飾されているか否かである。MPPB は窒素原子が修飾されていることで C SPR の向上や細胞増殖抑制などの一連の活性が弱められ、細胞に負荷を与えない程度に細胞を活性化する化合物になっていると考えられる。

#### 4.4 小括

本章では、rCHO 細胞の mAb の生産性向上に寄与する MPPB の活性中心は 2,5-DP であることを明らかにした。また、2,5-DP の活性はピロール構造とその芳香環のジアルキル化によって誘導され、ジアルキル置換の位置関係が CSPR の向上と細胞生存率の維持に非常に重要であることが明らかとなった。更に 2,5-DP は 0.32 mM の濃度で最も高い効果を発揮し MPPB と同様に VCD の抑制並びに細胞生存率の維持による培養期間の延長と mAb 濃度の向上を誘導する一方で、MPPB と同様にグルコースを維持したフェドバッチ培養では mAb 濃度を向上させないことも明らかとなった。本原因は細胞増殖の抑制の程度に対して CSPR の向上具合が弱いことが原因であるが、グルコースが十分な状態での CSPR の向上具合が低い原因は未解明であり 2,5-DP の作用機序に関しては更なる究明が必要である。更に MPPB は培養途中に添加した場合においても CSPR を向上させコントロールよりも mAb 濃度を向上させたが、2,5-DP の場合は培養途中に添加することで rCHO 細胞からの抗体の産生を止めてしまうことから、その活性の高さの代償として扱いの難しい化合物であることが分かった。

## 5. MPPB ならびに 2,5-DP の作用の一般性

前章までは MPPB ならびに 2,5-DP の特性を評価するために特定の mAb を生産する rCHO 細胞のみを取り扱ってきた。本章では MPPB ならびに 2,5-DP の作用の一般性を確認するために、前章までに取り扱ってきた rCHO 細胞以外の rCHO 細胞や宿主がチャイニーズハムスターではなくコッカー・スペイン由来である MDCK 細胞に適用した結果を述べる。また、MPPB と同様に G2/M に細胞周期を抑制し CSPR を向上させる塩化リチウムと MPPB および 2,5-DP を比較した結果を述べる。

第五章第一節(5.1.)では MPPB と 2,5-DP を複数の細胞に適応した際の最適濃度、細胞周期の変化ならびに細胞内 ATP 濃度への影響を調査した結果を記述し、第五章第二節(5.2.)ではフェドバッチ培養下で MPPB と 2,5-DP を複数の rCHO 細胞で評価した結果を述べる。最後に第五章第三節(5.3.)ではバッチ培養で塩化リチウムと MPPB および 2,5-DP を比較した結果を展開する。なお、細胞同士のクロスコンタミネーションを回避する都合上 rCHO 細胞と MDCK 細胞は同じ施設、装置では取り扱えない方針となっているため、MDCK 細胞の検討は無細胞系で評価可能な細胞内 ATP の変化に対してのみ実施した。

## 5.1 MPPB ならびに 2,5-DP の作用の一般性の確認

前章まで用いてきた IgG1 を生産する rCHO 細胞 (以後 rCHO-1) とは別の IgG1 を生産する rCHO 細胞 (以後 rCHO-2) と Fc 融合タンパク質を生産する rCHO 細胞 (以後 rCHO-F) の MPPB ならびに 2,5-DP への濃度応答性を評価した。評価項目として、rCHO-1 と同様に細胞増殖性、細胞生存率、CSPR を用いた。

また、前述したように細胞増殖に影響を与える化合物は細胞周期にも影響を与える例が多々報告されているため MPPB ならびに 2,5-DP が rCHO-1, rCHO-2, rCHO-F の細胞周期にどのような影響を与えるかを評価した。MPPB, 2,5-DP は各々細胞増殖抑制への影響濃度が異なることから各々が顕著に細胞増殖抑制を示し始める濃度で検討を実施した。即ち MPPB の場合 0.64 mM、2,5-DP の場合 0.32 mM で評価した。なお、MPPB による rCHO-1 の細胞周期データは第三章で用いたものを再掲している。

最後に、第三章で述べたように MPPB は CSPR を向上させるのみならず細胞内 ATP 濃度を向上させることが分かっているため MPPB ならびに 2,5-DP が rCHO-1, rCHO-2, rCHO-F、MDCK の細胞内 ATP 濃度に与える影響を評価した。

### 5.1.1 rCHO 細胞培養時の MPPB の適正濃度

最初に、バッチ培養において rCHO-2 と rCHO-F への MPPB の最適添加濃度を 0.08-1.28 mM の範囲で調査した。

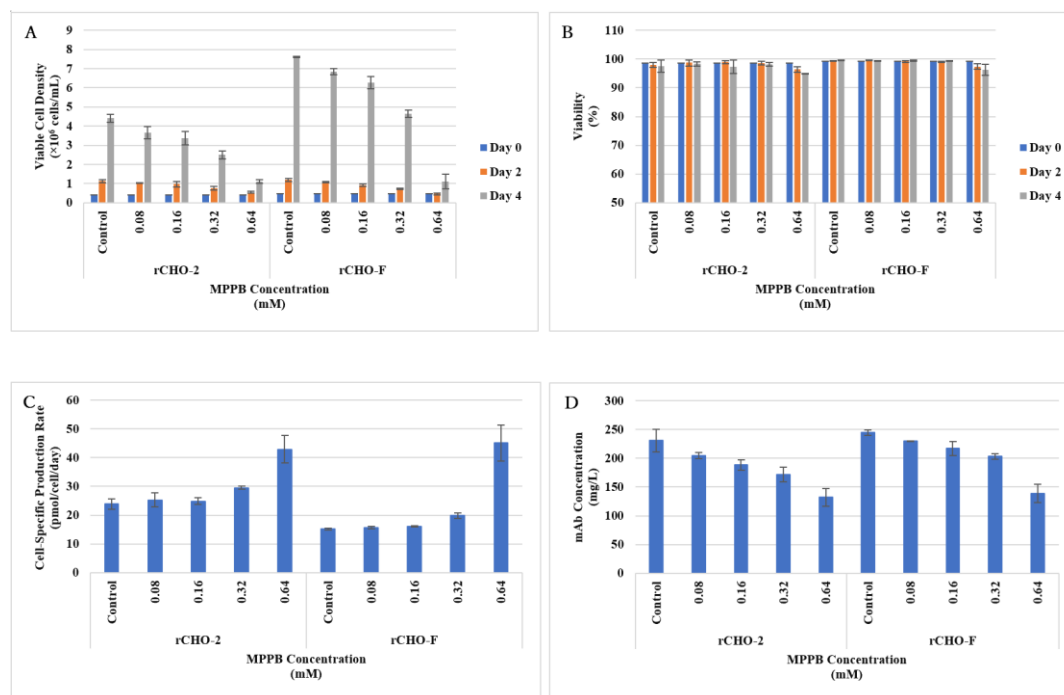


Figure 32 rCHO-2 と rCHO-F への MPPB の最適添加濃度の評価

MPPB を 0.08-0.64 mM の濃度で培養初日に添加し、培養 4 日目までの VCD (A)、細胞生存率 (B) を測定、培養 4 日目に mAb 濃度 (D) を評価した。また、IVCC に対する mAb 濃度の傾きから CSPR (C) を算出した<sup>37)</sup>。

MPPB の添加濃度が濃くなるにつれ VCD が低下し CSPR が向上する大まかな傾向は、rCHO-1 以外の細胞においても同様であった。0.64 mM の濃度では rCHO-2, rCHO-F 共に増殖が殆ど停止すると共に 5% 程度の細胞生存率の低下がみられた (Figure 32A and 32B)。一方、CSPR は rCHO-1 と同様に 0.32 mM 以上の濃度でみられ 0.64 mM では、第二章で述べたように rCHO-1 ではコントロールに対して 3.4 倍であったのに対し rCHO-2 の CSPR はコントロールの 1.75 倍となり rCHO-F においては 3.0 倍となった (Figure 32C)。mAb 濃度は rCHO-1 の場合と同様に細胞増殖

抑制の割合に対する C SPR の増加倍率が低いためコントロールよりも低くなる結果となった (Figure 32D)。



### 5.1.2 rCHO 細胞培養時の 2,5-DP の適正濃度

次に、バッチ培養において rCHO-2 と rCHO-F への 2,5-DP の最適添加濃度を 0.08-1.28 mM の範囲で調査した。

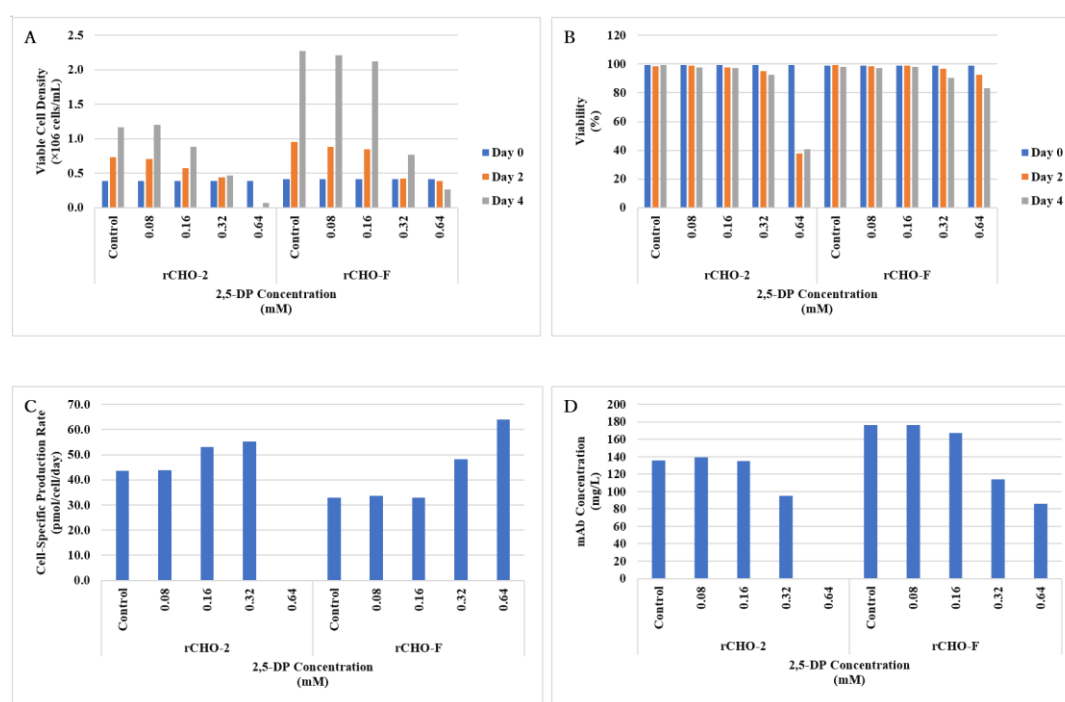


Figure 33 rCHO-2 と rCHO-F への 2,5-DP の最適添加濃度の評価

2,5-DP を 0.08-0.64 mM の濃度で培養初日に添加し、培養 4 日目までの VCD (A)、細胞生存率 (B) を測定、培養 4 日目に mAb 濃度 (D) を評価した。また、IVCC に対する mAb 濃度の傾きから CSPR (C) を算出した<sup>37)</sup>。0.64 mM 時の rCHO-2 の mAb 濃度は分析機器の誤作動により取得できていない。また、本実験は N=1 である。

2,5-DP の添加濃度が濃くなるにつれ VCD が低下し CSPR が向上する大まかな傾向は、rCHO-1 以外の細胞においても同様であった。2,5-DP の場合、MPPB よりも細胞増殖抑制効果が高いため MPPB 時の 0.64 mM よりも低い 0.32 mM の濃度で rCHO-2, rCHO-F 共に増殖が殆ど停止すると共に 5% 程度の細胞生存率の低下がみられた (Figure 33A and 33B)。なお、本傾向は第三章で述べたように rCHO-1 においても同じである。CSPR の向上は rCHO-2 の場合 rCHO-1 と同様に 0.16

mM から向上がみられ、rCHO-F の場合 0.32 mM 以上の濃度でみられた (Figure 33C)。0.32 mM における CSPR の向上倍率は rCHO-1 の場合 2.9 倍であったのに対し、rCHO-2 では 1.3 倍、rCHO-F では 2 倍であった。また、mAb 濃度は rCHO-1 の場合と同様に細胞増殖抑制の割合に対する CSPR の増加倍率が低いためコントロールよりも低くなる結果となった (Figure 33D)。

### 5.1.3 MPPB ならびに 2,5-DP による細胞周期への影響

rCHO-2 と rCHO-F を用いて、MPPB 0.64 mM 添加と 2,5-DP 0.32 mM 添加における細胞周期について非添加時との違いを調査した。

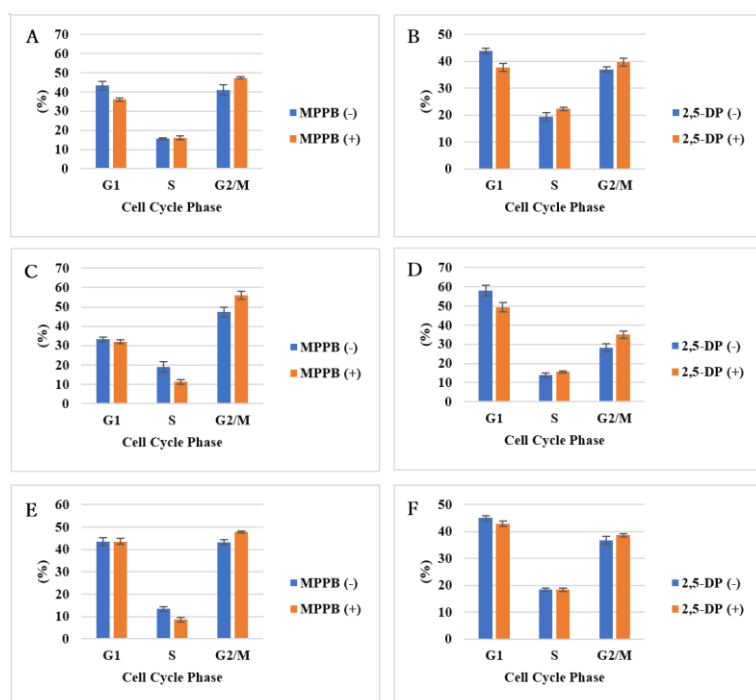


Figure 34 MPPB ならびに 2,5-DP による細胞周期への影響評価

培養初日に MPPB 0.64 mM、2,5-DP 0.32 mM の濃度に調整し、培養 4 日目に各々の細胞種 rCHO-1 (A, B), rCHO-2 (C, D), rCHO-F (E, F) の細胞周期を測定した。

MPPB による rCHO-1 の細胞周期への影響は、第二章で述べたように G1 フェーズを低下させ G2/M に細胞周期の割合を 6% 程度増加させる傾向がみられた (Figure 34A)。本傾向は rCHO-2、rCHO-F に対しても同様の傾向であり各々 G2/M を 9%、5% 増加させた (Figures 34C and 34E)。なお、rCHO-1 の場合は G1 フェーズを減少させたのに対し、rCHO-2, rCHO-F の場合は S フェーズが減少した (Figures 34C and 34E)。一方、2,5-DP の場合も MPPB と同様に G2/M を増加させたが rCHO-1, rCHO-2, rCHO-F の各々において増加率は 3%、7%、2% であり MPPB の場合よりも G2/M への移行率が低い結果であった (Figures 34B, 34D and 34F)。

### 5.1.4 MPPB ならびに 2,5-DP による細胞内 ATP 濃度への影響

MPPB が CSPR を向上させた理由が細胞内の ATP 量の増加にあるという仮説に基づき、MPPB が他の rCHO 細胞および MDCK 細胞における ATP 量に及ぼす影響を調査した。併せて、2,5-DP が各細胞に対して MPPB と同様の影響を示すか調査した。

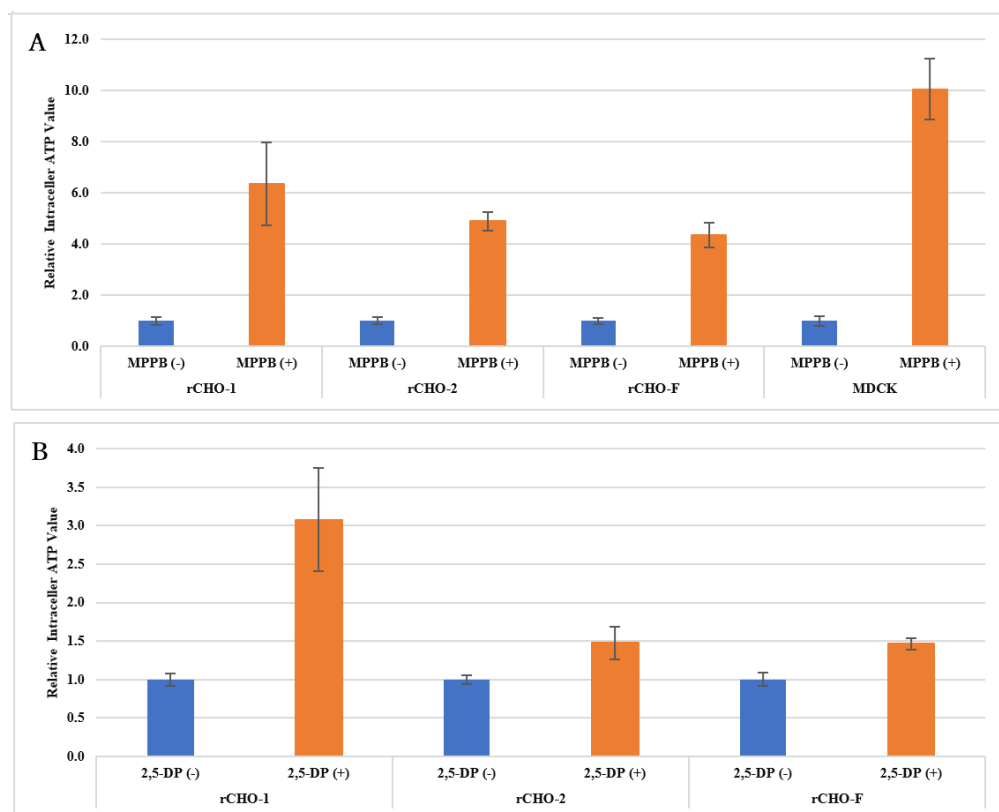


Figure 35 MPPB ならびに 2,5-DP による細胞内 ATP 濃度への影響評価

培養初日に MPPB 0.64 mM (A)、2,5-DP 0.32 mM (B) の濃度に調整し、培養 4 日目に各々の細胞種の細胞内 ATP 濃度を測定しコントロールに対する相対値を算出した。

0.64 mM の MPPB 濃度下ではいずれの細胞種もコントロールに対して細胞内 ATP 濃度を 4.4～10.1 倍向上させた。本効果は宿主がチャイニーズハムスターではなくコッカー・スペインである MDCK においても同じであった。なお、MDCK に関しては mAb を産生するための細胞として作製さ

れていないため C SPR などのデータは未取得である。また、0.32 mM の 2,5-DP の場合にも MPPB 同様にコントロールに対して細胞内 ATP 濃度を 1.5-3.1 倍向上させる効果がみられた。

## 5.2 MPPB ならびに 2,5-DP のフェドバッチ培養における作用の一般性の評価

フェドバッチ培養条件下で rCHO-1 以外の細胞種における MPPB と 2,5-DP の影響を評価した。各々の添加濃度は前章のバッチ培養条件下で評価した結果から MPPB 0.64 mM、2,5-DP 0.32 mM とした。rCHO-1 評価時と同じ培養条件で実施した。

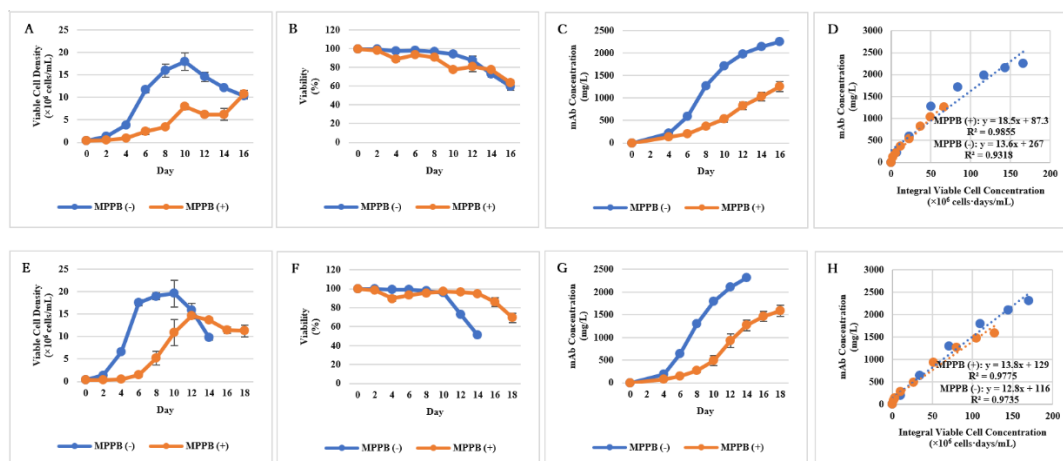


Figure 36 フェドバッチ条件下における MPPB の rCHO-2 と rCHO-F への影響評価

各細胞種について MPPB を 0.64 mM の濃度で培養初日に添加し、VCD (A: rCHO-2, E: rCHO-F)、細胞生存率 (B: rCHO-2, F: rCHO-F) を測定、培養 4 日目に mAb 濃度 (C: rCHO-2, G: rCHO-F) を評価した。また、IVCC に対する mAb 濃度の傾きから CSPR (D: rCHO-2, H: rCHO-F) を算出した<sup>37)</sup>。

rCHO-1 への MPPB 添加時と同様に rCHO-2, rCHO-F 共に MPPB の添加により細胞増殖が抑制 (Figures 36A and 36E) されると共に CSPR (Figures 36D and 36H) が向上した。また、rCHO-F に関しては細胞生存率の維持による培養期間の延長効果も見られた (Figure 36F)。CSPR も MPPB の添加により 10-40% 向上したが、VCD が MPPB の添加により 30~50% 抑制されるのに対して CSPR の向上率が低く、mAb 濃度は MPPB 添加時により低下した (Figures 36C, 36D, 36G and 36H)。

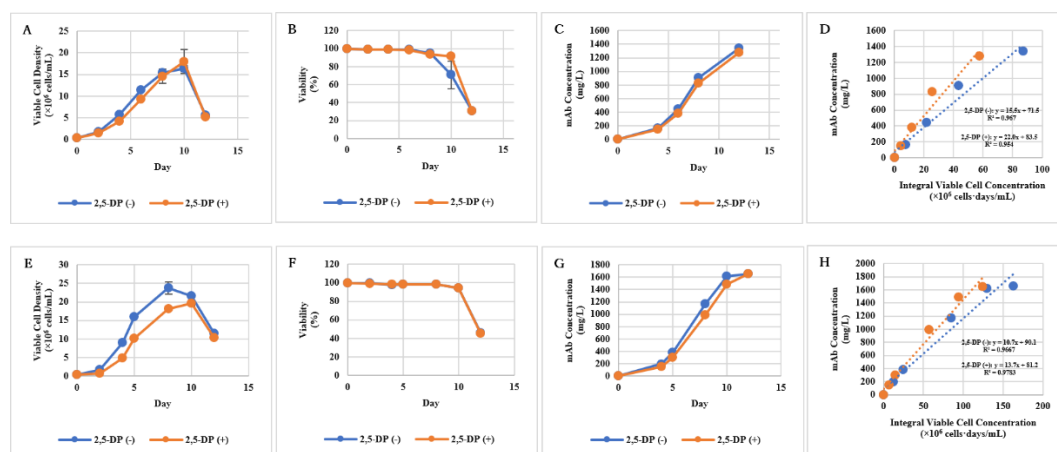


Figure 37 フェドバッチ条件下における 2,5-DP の rCHO-2 と rCHO-F への影響評価

各細胞種について 2,5-DP を 0.32 mM の濃度で培養初日に添加し、VCD (A: rCHO-2, E: rCHO-F)、細胞生存率 (B: rCHO-2, F: rCHO-F) を測定、培養 4 日目に mAb 濃度 (C: rCHO-2, G: rCHO-F) を評価した。また、IVCC に対する mAb 濃度の傾きから CSPR (D: rCHO-2, H: rCHO-F) を算出した<sup>37)</sup>。

rCHO-1 への 2,5-DP 添加時と同様に rCHO-2, rCHO-F 共に 2,5-DP の添加により細胞増殖が 20-40% 抑制 (Figures 37A and 37E) されると共に CSPR (Figures 37D and 37H) が向上した。2,5-DP の添加により rCHO-2 の細胞生存率はコントロールに対し培養途中では 20% 高く維持されたが、最終的な培養期間延長の効果はいずれの細胞でも確認できなかった。一方、CSPR は 2,5-DP の添加により rCHO-2 では 1.5 倍、rCHO-F では 1.3 倍となった (Figures 37D and 37H)。2,5-DP の添加による細胞増殖抑制効果と CSPR 向上の効果がつり合い、mAb 濃度は VCD が少ない 2,5-DP 添加時においてもコントロールと変わらない結果を得ることができた (Figures 37C and 37G)。

### 5.3 バッチ培養での MPPB ならびに 2,5-DP の塩化リチウムとの比較

塩化リチウム<sup>16)</sup>は無機化合物であるが、有機化合物である MPPB や 2,5-DP と同様に細胞周期を G2/M に偏らせると共に CSPR を向上させることが報告されている。本章では rCHO-1 を用い MPPB や 2,5-DP と類似の効果を有する塩化リチウムとの特性の差を評価する。なお、化合物の有効添加濃度、細胞増殖への影響、CSPR、単位細胞あたりのグルコース消費量を評価項目とした (Figure 38)。

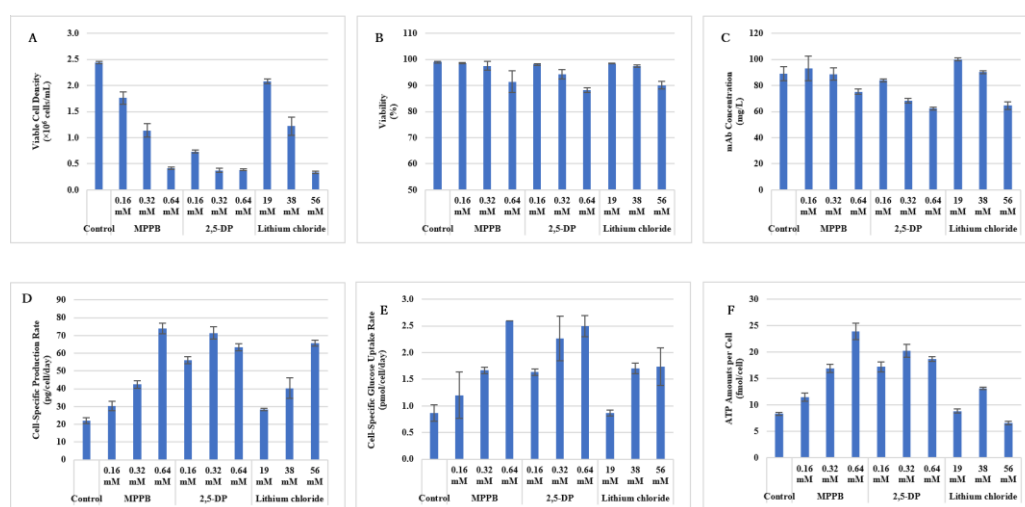


Figure 38 バッチ培養における塩化リチウムと MPPB および 2,5-DP の特性比較

化合物を図中の濃度で培養初日に添加し培養 3 日目に VCD (A)、細胞生存率 (B)、mAb 濃度 (C)、グルコース濃度、ATP 濃度を測定し、CSPR (D)、単位細胞あたりのグルコース消費量 (E)、単位細胞あたりの ATP 量 (F) を算出した。

MPPB と 2,5-DP が 80% 以上の細胞生存率を維持しながら細胞の増殖性や CSPR に影響を与える添加濃度は 0.16-0.64 mM であるのに対し、塩化リチウムの添加濃度は 19-56 mM であった。一方、mAb 濃度はコントロール 89 mg/L に対し MPPB が 0.16 mM 時に 93.2 mg/L、0.16 mM 2,5-DP 時に 84 mg/L、塩化リチウムが 19 mM 時に 100 mg/L であり 2,5-DP 以外は特定濃度でコントロールよりも高くなる傾向がみられた。また、各化合物の濃度向上と共に mAb 濃度が減少する傾向



はいずれの化合物も同じであった。一方、CSPR はコントロールが 22 pg/cell/day に対し、MPPB で 30-74 pg/cell/day、2,5-DP で 56-71 pg/cell/day、塩化リチウムで 28-66 pg/cell/day まで向上した。なお、2,5-DP は中間濃度の 0.32 mM で CSPR の向上はピークを迎え 0.64 mM では低下する傾向を示した。単位細胞当たりのグルコース消費量は、コントロールの 0.9 pmol/cell/day に対し MPPB で 1.2-2.6 pmol/cell/day、2,5-DP で 1.6-2.5 pmol/cell/day、塩化リチウムで 0.9-1.7 pmol/cell/day まで増加した。なお、塩化リチウムの場合は中間濃度の 38 mM でピークを迎えた。単位細胞あたりの細胞内 ATP 量はコントロールの 8 fmol/cell に対し、MPPB で 12-24 fmol/cell、2,5-DP で 17-20 fmol/cell、塩化リチウムで 9-13 fmol/cell まで増加した。なお、2,5-DP と塩化リチウムの場合、各々中間濃度の 0.32 mM と 38 mM でピークを迎えた。

## 5.4 考察

MPPB を複数の細胞 (rCHO-1, rCHO-2, rCHO-F) に適応した結果、培養 4 日目までの結果からはいずれの細胞も 0.32 mM 以降に顕著に細胞増殖が抑制されると共に CSPR が向上し、0.64 mM で細胞生存率が 5% 前後低下し始めることから、細胞種に拘らず MPPB の汎用的な添加濃度は 0.32-0.64 mM であると考えられる。また、0.64 mM で添加した場合、コントロールに対する細胞増殖の抑制倍率は、rCHO-1 0.16 倍、rCHO-2 0.25 倍、rCHO-F 0.14 倍となり、細胞によらず概ね 0.2 倍前後に増殖が抑制されることがわかる (Figure 32A)。一方、CSPR の増加倍率は、rCHO-1 2.7 倍、rCHO-2 1.8 倍、rCHO-F 3.0 倍であった (Figure 32C)。第二章で述べたように、MPPB は細胞の増殖を抑制するため、増殖に使用されていた細胞内のエネルギー源 (ATP) が mAb 生産に使用されて CSPR が向上している可能性がある。このことから、細胞増殖の抑制倍率と CSPR の増加倍率の積を算出すると rCHO-1 0.44、rCHO-2 0.45、rCHO-F 0.43 となり興味深いことに全ての細胞において積が 0.44 付近に一致した (Figure 32A and 32C)。これは即ち細胞増殖抑制率と CSPR 増加率は完全に相関しており、細胞増殖抑制が強いほど CSPR が増加し、逆に細胞増殖抑制が弱ければ CSPR の増加量は小さいことを意味する。また、細胞増殖の抑制倍率と CSPR の増加倍率の積が 0.44 であり 1 を下回っていることは、細胞増殖抑制倍率よりも CSPR の増加倍率が低いことを意味している。よって、単純計算では培養期間が同じであれば基本的に MPPB の添加により mAb 濃度が低下することがわかる (Figure 32D)。本結果は 2,5-DP においても同様の傾向であり、細胞増殖の抑制倍率と CSPR の増加倍率の積は 1 を下回ったが、rCHO-1 のみ 0.90 であり、rCHO-2 ならびに rCHO-F では各々 0.51 と 0.53 であった (Figure 33A and 33C)。なお、積が 2,5-DP において MPPB を上回ることは 2,5-DP の方が細胞増殖抑制に対する CSPR の増加効率が高いことを意味する。以上のことから細胞種によらず 0.32-0.64 mM の濃度で MPPB と 2,5-DP は細胞増殖抑制を伴う CSPR の向上効果を持つが、2,5-DP の方がその効率は若干高い可能性がある。更に CSPR 向上と関連があると推測される細胞内 ATP 量は MPPB ならびに 2,5-DP の添加によりチャイニーズハムスター由来の rCHO 細胞群に加え、コッカー・スペイン由来の MDCK 細胞においても増加することが明らかとなり、宿主の由来に拘らず ATP を向上させることが示された (Figure 35)。

更に、全ての rCHO 細胞種において MPPB ならびに 2,5-DP の添加により細胞周期は G1 もしくは S から G2/M に偏る傾向があり、本結果からも MPPB ならびに 2,5-DP の細胞に与える影響は rCHO 細胞種に依存せず一般性が高いことが示された(Figure 34)。

一方、MPPB と 2,5-DP をフェドバッチ培養で rCHO-2、rCHO-F の両細胞で評価した結果、MPPB の添加時にはいずれの細胞でも細胞増殖は抑制され、rCHO-F においては細胞培養日数を延長する効果も得られた(Figures 36A, 36B, 36E and 36F)。しかし、CSPR の増加率に比べて細胞増殖抑制率が高く mAb 濃度は低くなる結果となった(Figures 36C, 36D, 36G and 36H)。一方、2,5-DP の添加時にも rCHO-2、rCHO-F の両細胞において培養期間中 VCD が抑制されたが、CSPR が十分に増加したことで最終的な mAb 濃度はコントロールと同じ結果を達成している(Figures 37C, 37D, 36G and 36H)。

以上の結果から、MPPB や 2,5-DP は 0.32-0.64 mM の濃度で添加することにより、細胞種問わず細胞増殖を抑制する効果を有している。また、細胞種によっては細胞生存率が数日延長され、長期間培養可能になる。更に CSPR もいずれの細胞種においても増加し、細胞増殖の抑制による mAb 生産性低下を上回る程度に増加する場合には mAb 濃度も非添加時と同等になることが分かった。なお、rCHO-2 と rCHO-F の細胞においては mAb 濃度の向上には至らなかったが、細胞増殖を抑制しながら mAb 濃度を維持することに成功している点は製造上の利点とも成り得る。即ち動物細胞を用いた培養においては、ラボから商用に向けて製造スケールを上げるにつれて酸素通気や二酸化炭素の除去効率が低くなり<sup>61, 62)</sup>培養槽あたりの育成可能な最大細胞密度が低下すると共に、細胞自体が体積を持つために細胞密度が高い場合には培養槽あたりの mAb などの目的物が占める割合が低くなることが知られている<sup>23)</sup>。よって、製造スケールを上げるのが難しい程度に細胞増殖性が高い場合には、細胞増殖を抑制しながら mAb 濃度を維持できる本結果が有用な場合があると考えられる。

最後に無機化合物でありながら有機化合物である MPPB と 2,5-DP と類似の効果を持つと報告されている塩化リチウムとの特性比較をした結果の考察を述べる。MPPB や 2,5-DP が 0.16-0.64 mM 程度で細胞増殖を抑制するのにに対し塩化リチウムは 19-56 mM で抑制し、各々の最大濃度では細

胞生存率が 90%まで低下することから、細胞生存率を基準に各々の最適添加濃度を考慮すると試験条件は各々の化合物の特性を比較する条件として適切であると考えた (Figures 38A and 38B)。本結果からは MPPB や 2,5-DP は塩化リチウムよりも 100 倍程度希薄な条件で細胞に影響を及ぼすことから諸々の活性が塩化リチウムより 100 倍程度高いことが示唆された。また、最大添加濃度を基準に考えると、2,5-DP、MPPB、塩化リチウムの順に濃度が薄い場合にも細胞増殖を抑制する効果が高く、MPPB や 2,5-DP は塩化リチウムよりも細胞増殖を抑制する濃度範囲も広いことが示された。また、CSPR の増加は細胞増殖抑制効果が強いほど高く、検討した濃度範囲では 2,5-DP、MPPB、塩化リチウムの順に CSPR を増加させる傾向が高いことが分かった。MPPB と塩化リチウムは細胞増殖抑制の程度が近似していることから CSPR の増加傾向も近似している。増殖抑制効果が顕著に高い 2,5-DP においては広い濃度範囲で CSPR を高める傾向がみられた (Figure 38D)。なお、塩化リチウムによる細胞増殖抑制と CSPR の増加は Ha らによる報告通りであった。しかし、単位当たりのグルコースの消費量が MPPB と 2,5-DP のみならず塩化リチウムにおいても増加したことは新たな知見である。一方、MPPB と 2,5-DP の場合には細胞増殖抑制が生じる場合には必ず単位細胞当たりのグルコース消費量が向上し、細胞増殖抑制の飽和とともにグルコースの消費量が維持される傾向がみられたが、塩化リチウムの場合には最大濃度付近の 38-56 mM では細胞増殖が MPPB の 0.32-0.64 mM 時と同程度に抑制されたにも拘らず単位細胞当たりのグルコースの消費量は増加しなかった (Figure 38E)。即ち塩化リチウムの最大濃度時の応答は MPPB や 2,5-DP とは異なっており、最大濃度の 56 mM ではエネルギーを向上させる方向に働いていないことがわかる。なお、単位細胞当たりのグルコース消費量は細胞内 ATP 濃度と相関しているが、56 mM の塩化リチウム濃度下では単位当たりのグルコース消費量は 38 mM 時に対して維持されているにも拘らず細胞内 ATP 濃度が低下していた。このとき CSPR が増加していることから、細胞内 ATP が CSPR の増加に使用されて減少した可能性がある。このように、塩化リチウムの 56 mM の濃度では MPPB や 2,5-DP と挙動が異なる傾向がみられたが、この理由を次のように考察する。塩化リチウム 19-56 mM の添加は初期培地の浸透圧 ca. 280 mOsm に対して浸透圧が 38-112 mOsm 加わることを意味し、即ち 318-392 mOsm まで上昇していることを意味する。Alhuthali<sup>63)</sup>らや Takagi<sup>64)</sup>らは浸透圧が細胞増殖の抑

制や CSPR の向上に影響することを報告しており、浸透圧の影響は 400 mOsm 前後で明確に表れる。今回の実験では塩化リチウム 56 mM 添加時には浸透圧は 392 mOsm 程度まで上昇していることから、一連の細胞増殖の抑制や CSPR の上昇効果は、塩化リチウムによる影響ではなく浸透圧に依存した影響の可能性がある。一方、MPPB と 2,5-DP の添加濃度は 0.32-0.64 mM であり、浸透圧は 0.32-0.64 mOsm の上昇に留まり全体の ca. 0.1%と無視できることから、MPPB と 2,5-DP による細胞増殖抑制や CSPR の向上効果は浸透圧の影響ではなく化合物自体の効果と考えられる。

MPPB や 2,5-DP の特性からこれらの化合物の適用が有効なケースを考察した。多くの場合小スケールでは攪拌速度や酸素流量の向上が容易であり細胞の維持に必要な酸素供給量を確保し易いため一般的な酸素要求量<sup>65, 66)</sup>の場合、 $100 \times 10^6$  cells/mL 以上の細胞密度の維持も可能である。しかし、スケールが向上するにつれ機器の耐久性やスケールアップに伴う体積当たりの表面積の相対的な低下によるスパージャーの設置面積の低下により攪拌不足や不十分な酸素流量に陥りやすく、製造スケールで維持可能な細胞密度は  $100 \times 10^6$  cells/mL 未満(多くは  $30 \times 10^6$  cells/mL 前後)に制限される。よって、細胞密度(付随する酸素要求量)がスケールアップ不可能な程度まで増加する細胞種の場合にはスケールアップ可能な細胞密度まで抑制し培養する必要がある。そのような場合には、MPPB や 2,5-DP は細胞密度を抑えながらコントロール条件と同程度の mAb 濃度を維持できる点で有用な試薬に成り得る。

## 5.5 小括

MPPB と 2,5-DP は、rCHO-1 細胞と同一のホストセルを起源としトランスフェクションされた目的タンパク質が異なるのみの rCHO-2、rCHO-F のいずれの細胞においても、0.32-0.64 mM の濃度で細胞増殖を抑制すると共に単位細胞当たりのグルコース消費量を向上させ、且つ、CSPR と細胞内 ATP 濃度を向上させた。更に、MPPB 宿主が異なる MDCK 細胞においても ATP を向上させることから MPPB と 2,5-DP の効果は細胞種に依存しないことが推定された。

一方、MPPB と 2,5-DP は、コントロール条件よりも mAb 濃度を向上させる点と細胞生存率維持による培養期間の延長効果の点では必ずしも優位に働くことを保証するわけではないが、細胞増殖抑制と単位細胞当たりのグルコース消費量の増加ならびに細胞内 ATP 濃度の向上、そして CSPR の増加効果はいずれの細胞にも有効と考えられる結果が得られた。また、同様の効果を示すと報告されていた塩化リチウムは、浸透圧の影響で一連の効果を細胞に与えている可能性が示された。また、塩化リチウムの最大添加濃度時には MPPB や 2,5-DP と異なり細胞内 ATP が枯渇傾向にあることも分かり、更なる ATP を用いた細胞内代謝の向上は難しい状態になっていると考えられる。このことから、浸透圧に影響せず細胞内 ATP を維持できる MPPB や 2,5-DP の有用性は塩化リチウムよりも高いと考えられる。

## 6. 結論

本研究では昨今益々利用されるようになってきているバイオ医薬品の生産性向上に貢献するために、rCHO 細胞による目的タンパク質の発現量向上を誘導する低分子化合物の探索研究を実施した。BINDS (東京大学、大阪大学、東北大学) から入手した化合物ライブラリをスクリーニングし、東京大学の化合物ライブラリに登録されている化合物の類縁体であると共にインドの S.E.T's 薬科大学で抗マalaria薬として開発された MPPB が最も rCHO の CSPR を向上させると共に入手性の観点からも実用的な化合物であることを発見した。MPPB の活性中心は 2,5-DP であり MPPB、2,5-DP 共に 0.32-0.64 mM の濃度で細胞増殖抑制能を有し細胞周期を G2/M に偏らせると共に、単位細胞当たりのグルコース消費量ならびに細胞内 ATP 濃度を向上させ CSPR を向上させる化合物であった。バイオ医薬品の製造に用いられるバッチ培養ならびにフェドバッチ培養にて MPPB、2,5-DP を添加し、rCHO 細胞と mAb 濃度に与える影響を評価したところ細胞増殖の抑制は本来、目的タンパク質の生産濃度を低下させるが MPPB、2,5-DP は CSPR を向上させるため、試験に用いられた一部の rCHO 細胞では細胞増殖が抑制されたにもかかわらず目的タンパク質の濃度は化合物を添加しない場合と同等以上であった。更に MPPB の添加を複数回に分けることで mAb の濃度の向上がみられるケースも確認された。MPPB や 2,5-DP のような細胞増殖を抑制し CSPR を向上させる化合物の用法は、mAb 濃度が向上する rCHO 細胞の場合には単純に添加剤として使用することが想定される。一方、細胞種が適合せず、高過ぎる細胞増殖抑制効果のために mAb 濃度が向上しない場合には、スケールアップ時の培養槽で育成可能な細胞密度まで細胞増殖を抑制する必要がある場合に用いることが最も適していると考えられる。

なお、序章で述べたように、塩化リチウムを初めとして細胞増殖を抑制し CSPR ならびに目的タンパク質濃度を向上させる化合物が幾つか報告されているが、今回の研究のようにグルコースの消費量の向上や細胞内 ATP 濃度の向上といった細胞の代謝面から解析した研究は知られていない。一方、今回の研究では MPPB ならびに 2,5-DP が細胞の何に作用し一連の効果を生じさせているかが全く未解明であることから、作用機序の解明が今後の課題として残っている。

今回の一連の化合物スクリーニングの成果物として **MPPB** ならびに **2,5-DP** 以外にもスクリーニング時に **mAb** 濃度を向上させた化合物は複数存在することから、今後の更なる探求により、一層 **mAb** 濃度を向上させる化合物を発見する余地はあると考えられる。今後も低分子化合物による **rCHO** 細胞の目的タンパク質の生産性向上に関する研究の発展が期待される。



## 7. 実験の部

### 7.1 抗体生産株と細胞培養用培地

試験に使用した rCHO 細胞は、市販されている CHO-S 細胞 (サーツモフィッシャーサイエンティフィック、アメリカ合衆国) に学術研究用に開発された免疫グロブリン G1 (第一三共株式会社) の発現ベクターを組み込むことにより作製された。rCHO 細胞の拡大培養ならびに生産培養時の基礎培地には、L-Alanyl-L-Glutamine (味の素株式会社) が 1 mM の濃度になるように調整した自社培地 (味の素ヘルシーサプライ株式会社) を用いた。また、生産培養時の流加培地には社内で開発した流加培地 (味の素ヘルシーサプライ株式会社) を用いた。

### 7.2 低分子化合物ライブラリ

1次スクリーニングには、主に BIDS に所属する東京大学、大阪大学、東北大学の有する化合物ライブラリ (各々 9,600 個、6480 個、7147 個の合計 23,227 個) を用いた。これらの化合物ライブラリは市販の医薬品に加え各大学の基礎研究時に新規に生み出された合成中間体から構成されている。2次スクリーニング以降には 1 mg - 1 g の化合物量が必要であるのに対し BINDS から供与された化合物量 (20 µg 程度) では不足するため、1次スクリーニングの結果得られた候補化合物である 72 種の低分子ライブラリを、市販化合物の購入と化合物の合成受託を行っている ATTO 株式会社に合成依頼を行う事により入手した。なお、化学合成の難易度が高く ATTO 株式会社からも入手が難しい一部の化合物に関しては類似化合物として入手し 2次スクリーニングの中で再評価した。

### 7.3 拡大培養条件

Erlenmeyer Flask (Corning 社、125~250 mL) に播種後の rCHO 細胞密度が  $0.3 \times 10^6$  cells/mL になるように培養液を調整 (50~100 mL) し、5% 二酸化炭素雰囲気下、37 °C、120 rpm (振幅 20 mm) の条件で 3~4 日間培養を行った。

## 7.4 1次スクリーニング方法

CELLSTAR 96 Well Suspension Culture Plate (greiner bio-one 社)の全面に  $0.3 \times 10^6$  cells/mL の細胞培養液を 198  $\mu$ L ずつ添加し、プレートの 1 列と 12 列には DMSO を 2  $\mu$ L 添加しコントロール群とした。プレートの 2 列から 11 列には化合物ライブラリの化合物 (2~10 mg/L DMSO soln.) を 2  $\mu$ L ずつ添加しプレート 1 枚辺り 80 個の化合物を 5% 二酸化炭素雰囲気下、37  $^{\circ}$ C、120 rpm (振幅 20 mm) の条件で 3~4 日間培養を行うことで評価した。なお、東北大学の化合物ライブラリは入手時に 96 well plate 全面に化合物が予め 2  $\mu$ L ずつ仕込まれていたことから  $0.3 \times 10^6$  cells/mL の細胞培養液を 198  $\mu$ L ずつ添加すると共に、別途 96 well plate 全面を 0.1% (vol./vol.) DMSO の細胞培養液としたプレートをコントロールとし前述の培養条件で評価した。培養後の各々の培養液中の mAb 濃度を Octet QKe (ForteBio 社) を用いて一斉分析し、下記の式を用いた計算値が正となる化合物を 2 次スクリーニングの評価対象とした。

$$((\text{各々の化合物添加時の mAb 濃度}) - (\text{コントロールの平均 mAb 濃度} + 3 \times \text{標準偏差}))$$

## 7.5 2次スクリーニング方法

50 mL 浮遊培養フラスコ (Greiner Bio-One) に培養液量 10 mL、目標生細胞密度  $0.3 \times 10^6$  cells/mL になるように rCHO 細胞を播種した。その後、1 次スクリーニングで選定した 73 個の化合物を各々 100 mg / mL の濃度で DMSO に溶解した溶液 10  $\mu$ L を培養初日に培養液に添加し、5% 二酸化炭素雰囲気下、37  $^{\circ}$ C、静置条件で 3 日間培養した。培養終了後、細胞生存率、mAb 生産濃度、単位細胞あたりの mAb 生産性の 3 つの観点から 4 つの候補化合物を選定した。

## 7.6 化合物の最終選定

50 mL 浮遊培養フラスコ (Greiner Bio-One) に培養液量 10 mL、目標生細胞密度  $0.3 \times 10^6$  cells/mL になるように rCHO 細胞を播種した。2 次スクリーニングで選定した 4 つの候補化合物を 2 次スクリーニングと同じ条件で再評価 (N=3) し、細胞生存率、mAb 生産濃度、単位細胞あたりの mAb 生産性ならびに化合物の入手性の観点から化合物の選定を実施した。

## 7.7 バッチ培養による MPPB の各種特性解析の条件

50 mL 浮遊培養フラスコ (Greiner Bio-One) に培養液量 10 mL、目標生細胞密度  $0.3 \times 10^6$  cells/mL になるように rCHO 細胞を播種した。その後、評価化合物を目的の濃度で DMSO に溶解した溶液 10  $\mu$ L を培養初日に培養液に添加し、5% 二酸化炭素雰囲気下、37 °C、120 rpm (振幅 20 mm) の条件で 3~10 日間培養を行った。

## 7.8 フェドバッチ培養による評価条件

125 mL 浮遊培養フラスコ (Corning) に培養液量 50 mL、目標生細胞密度  $0.3 \times 10^6$  cells/mL になるように rCHO 細胞を播種した。その後、評価化合物を目的の濃度で DMSO に溶解した溶液 50  $\mu$ L を培養初日に培養液に添加し、5% 二酸化炭素雰囲気下、37 °C、120 rpm (振幅 20 mm) の条件で生細胞率が 70% 以下になるまで培養を行った。

## 7.9 バッチ培養による MPPB 添加方法の検討条件

50 mL 浮遊培養フラスコ (Greiner Bio-One) に培養液量 10 mL、目標生細胞密度  $0.3 \times 10^6$  cells/mL になるように rCHO 細胞を播種し、5% 二酸化炭素雰囲気下、37 °C、120 rpm (振幅 20 mm) の条件で生細胞率が 70% 以下になるまで培養を行った。なお、最終的な MPPB が 0.64 mM になるように培養初日から培養 4 日目にかけて 200 mg/mL の MPPB DMSO 溶液を総量 10  $\mu$ L 添加した (培養初日に 10  $\mu$ L 添加、培養 2 と 4 日目に 5  $\mu$ L 添加、培養 4 日目に 10  $\mu$ L 添加の 3 条件)。

## 7.10 生細胞細胞密度と細胞生存率の測定

トリパンブルーによる死細胞の染色ならびに細胞数の自動計測を行う Vi-CELL XR (Beckman Coulter) を用いた生細胞密度と細胞生存率の測定を実施した。実施プロトコルは製品手順に従った。なお、培養 5 日目以降のすべての測定においては 2 倍希釈で分析した。

### 7.11 代謝物の測定

細胞培養液から細胞を 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターを用いて除細胞し、除細胞液を BioProfile FLEX2 (Nova Biomedical) に注入した。グルコースとラクテートの濃度を BioProfile FLEX2 のセンサーカード中の酵素膜によるグルコースとラクテートの選択的な還元時に生じる過酸化水素の発生量を基に自動分析した。なお、実施プロトコルは製品手順に従った。

### 7.12 mAb の濃度測定

細胞培養液から細胞を 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターを用いて除細胞し、除細胞液を高速液体クロマトグラフィ (Agilent technology) と PA ImmunoDetection Sensor Cartridge (ID 2.1  $\times$  30 mm, Applied Biosystems) を用いて測定した (検出波長 280 nm)。なお、全ての抗体濃度は社内で標準品として使用している特定の mAb に対する相対値として算出した (真値からの誤差 ca.20% 以内)。

### 7.13 細胞内 ATP 濃度の測定

ATP 量をホタル・ルシフェラーゼ発光法により定量する Intracellular ATP assay kit (v2, Toyo B-Net) を用い rCHO 細胞内の ATP 濃度を測定した。細胞培養液 (100  $\mu\text{L}$ ) をリン酸バッファー (1 mL) で希釈後、遠心分離 (450 g, 5 分) を行い遠心後の上清 (1 mL) を除去する操作を 2 度実施した。得られた細胞ペレットを ATP extraction reagent (0.5 mL) で懸濁し 5 分静置した。ATP 抽出液 10  $\mu\text{L}$  を luciferase luminescence assay reagent 100  $\mu\text{L}$  に懸濁し 30 分以内に Infinite M Plex plate reader (Tecan) を用いて分析した<sup>67)</sup>。得られた ATP 濃度を試験に使用した細胞密度で除すことで単位細胞あたりの ATP 濃度に換算した。

### 7.14 各種単位細胞あたりの数値の算出

CSPR (pg/cell/day)、単位細胞あたりのグルコース消費速度 (pmol/cell/day)、そして単位細胞あたりのラクテート蓄積速度 (pmol/cell/day) は、各々 mAb 濃度 (mg/L)、消費グルコース濃度 (mM)、

そして蓄積ラクトース濃度 (mM) の積算生細胞密度 (cells·day) / mL) に対する傾きとして求められた (28, 29)。

### 7.15 N 型糖鎖の分析

細胞培養液から細胞を 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターを用いて除細胞し、除細胞液を Spin column-based antibody purification kit (Cosmo Bio) を用いて精製した。続いて精製液中の mAb を EZGlyco mAb-N kit (Sumitomo Bakelite) を用いて 2-AB 化し、高速液体クロマトグラフィーと XBridge BEH Amide XP Column (2.5  $\mu\text{m}$ , ID 4.6  $\times$  150 mm, Waters Corporation) を用いて分析した (検出波長 420 nm)。いずれも実施プロトコルは製品手順に従った。

### 7.16 統計解析

化合物選定以降は N=3 で実験を実施し、JMP 統計解析ソフトウェア (SAS) もしくは Excel を用いて平均値と標準偏差を算出した。

## 8. 引用文献

1. Pento JT. Monoclonal antibodies for the treatment of cancer. *Anticancer Res.* 2017 Nov;37(11):5935-9. doi: 10.21873/anticanres.12040.
2. Yoo SM, Chung SH. Targets of monoclonal antibodies for immunological diseases. *Arch. Pharm. Res.* 2019;42:293-304. doi: 10.1007/s12272-018-1087-2.
3. Qu J, Wang L, Jiang M, Zhao D, Wang Y, Zhang F, et al. A review about pembrolizumab in first-line treatment of advanced NSCLC: focus on KEYNOTE studies. *Cancer Manag Res.* 2020;12:6493-509. doi: 10.2147/CMAR.S257188.
4. Keating GM. Nivolumab: a review in advanced nonsquamous non-small cell lung cancer. *Drugs.* 2016 Jun;76(9):969-78. doi: 10.1007/s40265-016-0589-9.
5. McKeage K, Perry CM. Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. *Drugs.* 2002;62(1):209-43. doi: 10.2165/00003495-200262010-00008.
6. Bain B., Brazil M. Adalimumab. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2:693-4. doi: /10.1038/nrd1182
7. Siddiqui MA, Scott LJ. Infliximab: a review of its use in Crohn's disease and rheumatoid arthritis. *Drugs.* 2005;65(15):2179-208. doi: 10.2165/00003495-200565150-00014.

8. Mohammadian O, Rajabibazl M, Pourmaleki E, Bayat H, Ahani R, Rahimpour A.  
Development of an improved lentiviral based vector system for the stable  
expression of monoclonal antibody in CHO cells. *Prep Biochem Biotechnol.*  
2019;49(8):822-29. doi: 10.1080/10826068.2019.1621893.
9. Gupta K, Parasnis M, Jain R, Dandekar P. Vector-related stratagems for  
enhanced monoclonal antibody production in mammalian cells. *Biotechnol Adv.*  
2019 Dec;37(8):107415. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.107415.
10. Wurm FM, Wurm MJ. Cloning of CHO cells, productivity and genetic stability—a  
discussion. *Processes.* 2017; 5(2):20. doi: 10.3390/pr5020020.
11. Fan Y, Jimenez Del Val I, Muller C, Sen JW, Rasmussen SK, Kontoravdi C, et al.  
Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture affects  
antibody production and glycosylation. *Biotechnology and Bioengineering.* 2014  
Sep;12:521-35. doi: 10.1002/bit.25450.
12. Xiao Z, Sabourin M, Piras G, Gorfien SF. Screening and optimization of  
chemically defined media and feeds with integrated and statistical approaches.  
*Methods Mol Biol.* 2014;1104:117-35. doi: 10.1007/978-1-62703-733-4\_9.
13. Ghafari-Esfahani A, Shokri R, Sharifi A, Shafiee L, Khosravi R, Kaghazian H, et  
al. Optimization of parameters affecting on CHO cell culture producing

recombinant erythropoietin. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 2020 Apr;50(8):834-41. doi: 10.1080/10826068.2020.1753072.

14. Trummer E, Fauland K, Seidinger S, Schriebl K, Lattenmayer C, Kunert R, et al.

Process parameter shifting: part I. Effect of DOT, pH, and temperature on the performance of Epo-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 2006 Aug;94(6):1033-44. doi: org/10.1002/bit.21013.

15. Liu CH, Chen LH. Promotion of recombinant macrophage colony stimulating

factor production by dimethyl sulfoxide addition in Chinese hamster ovary cells. *J Biosci Bioeng*. 2007 Jan;103(1):45-9. doi: 10.1263/jbb.103.45.

16. 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;98:9239-48. doi: 10.1007/s00253-014-6012-0.

17. Jiang Z, Sharfstein ST. Sodium butyrate stimulates monoclonal antibody over-

expression in CHO cells by improving gene accessibility. *Biotechnol Bioeng*. 2008 May 1;100(1):189-94. doi: 10.1002/bit.21726.



18. 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 Mar;11(4):487-96. doi: 10.1002/biot.201500327.
19. 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 May;56(5):421-8. doi: 10.1007/s12033-013-9725-x.
20. Toronjo-Urquiza L, James DC, Nagy T, Falconer RJ. Screening naturally occurring phenolic antioxidants for their suitability as additives to CHO cell culture media used to produce monoclonal antibodies. *Antioxidants (Basel)*. 2019 Jun 3;8(6):159. doi: 10.3390/antiox8060159.
21. Yamano N, Omasa T. EGCG improves recombinant protein productivity in Chinese hamster ovary cell cultures via cell proliferation control. *Cytotechnology*. 2018;70(6):1697-1706. doi:10.1007/s10616-018-0243-3.
22. Chen F, Fan L, Wang J, Zhou Y, Ye Z, Zhao L, et al. Insight into the roles of hypoxanthine and thymidine on cultivating antibody-producing CHO cells: cell growth, antibody production and long-term stability. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012 Jan;93(1):169-78. doi: 10.1007/s00253-011-3484-z.

23. 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 Jan;112(1):141-55. doi: 10.1002/bit.25332.
24. Baek E, Lee JS, Lee GM. Untangling the mechanism of 3-methyladenine in enhancing the specific productivity: transcriptome analysis of recombinant Chinese hamster ovary cells treated with 3-methyladenine. *Biotechnol Bioeng.* 2018 Sep;115(9):2243-54. doi: 10.1002/bit.26777.
25. Arden N, Ahn SH, Vaz W, Rhodes M, Hancock C, Abitorabi MA, et al. Chemical caspase inhibitors enhance cell culture viabilities and protein titer. *Biotechnol Prog.* 2007;23:506-11. doi: 10.1021/bp060222m.
26. Malo A, Krüger B, Göke B, Kubisch CH. 4-Phenylbutyric acid reduces endoplasmic reticulum stress, trypsin activation, and acinar cell apoptosis while increasing secretion in rat pancreatic acini. *Pancreas.* 2013 Jan;42(1):92-101. doi: 10.1097/MPA.0b013e318259f6ca.
27. Andersen E, Chollet ME, Baroni M, Pinotti M, Bernardi F, Skarpen E, et al. The effect of the chemical chaperone 4-phenylbutyrate on secretion and activity of

the p.Q160R missense variant of coagulation factor FVII. *Cell Biosci.* 2019; 9 (69). doi:10.1186/s13578-019-0333-8.

28. Joshi SD, More Y, Vagdevi HM, Vaidya VP, Gadaginamath GS, Kulkarni VH.

Synthesis of new 4-(2,5-dimethylpyrrol-1-yl)/4-pyrrol-1-yl benzoic acid hydrazide analogs and some derived oxadiazole, triazole and pyrrole ring systems: a novel class of potential antibacterial, antifungal and antitubercular agents. *Med Chem Res.* 2013;22:1073-89. doi: 10.1007/s00044-012-0112-0.

29. Joshi SD, More UA, Dixit SR, Korat HH, Aminabhavi TM, Badiger AM. Synthesis,

characterization, biological activity, and 3D-QSAR studies on some novel class of pyrrole derivatives as antitubercular agents. *Med Chem Res.* 2014;23:1123-47. doi: 10.1007/s00044-013-0709-y.

30. Zhao T, Zhao Z, Lu F, Chang S, Zhang J, Pang J, et al. Two- and three-

dimensional QSAR studies on hURAT1 inhibitors with flexible linkers: topomer CoMFA and HQSAR. *Mol Divers.* 2020;24:141-54. doi: 10.1007/s11030-019-09936-5.

31. Zhu T, Cao S, Su PC, Patel R, Shah D, Chokshi HB, et al. Hit identification and

optimization in virtual screening: practical recommendations based on a critical literature analysis. *J Med Chem.* 2013;56(17):6560-72. doi:10.1021/jm301916b.

32. Handlogten MW, Zhu M, Ahuja S. Intracellular response of CHO cells to oxidative stress and its influence on metabolism and antibody production. *Biochemical Engineering Journal*. 2018;133(15):12-20. doi:10.1016/j.bej.2018.01.031.
33. Maharjan S, Oku M, Tsuda M, Hoseki J, Sakai Y. Mitochondrial impairment triggers cytosolic oxidative stress and cell death following proteasome inhibition. *Sci Rep*. 2014;4:5896. doi.org/10.1038/srep05896.
34. Chevallier V, Schoof EM, Malphettes L, Andersen MR, Workman CT. Characterization of glutathione proteome in CHO cells and its relationship with productivity and cholesterol synthesis. *Biotechnology and Bioengineering*. 2020;117(11):3448-58. doi.org/10.1002/bit.27495.
35. Becker M, Junghans L, Teleki A, Bechmann J, Takors R. The less the better: how suppressed base addition boosts production of monoclonal antibodies with Chinese hamster ovary cells. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019;7:76. doi: 10.3389/fbioe.2019.00076.
36. Hara KY, Kondo A. ATP regulation in bioproduction. *Microb Cell Fact*. 2015;14:198. doi: 10.1186/s12934-015-0390-6.
37. Renard JM, Spagnoli R, Mazier C, Salles MF, Mandine E. Evidence that monoclonal antibody production kinetics is related to the integral of the viable

cells curve in batch systems. *Biotechnol Lett.* 1988;10(2):91-6. doi:

10.1007/BF01024632.

38. Chen F, Ye Z, Zhao L, Liu X, Fan L, Tan WS. Correlation of antibody production rate with glucose and lactate metabolism in Chinese hamster ovary cells.

*Biotechnol Lett.* 2012;34:425-32. doi: 10.1007/s10529-011-0798-y.

39. Hodoniczky J, Zheng YZ, James DC. Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc *N*-glycan remodeling in vitro. *Biotechnol Prog.*

2005;21:1644-52. doi: 10.1021/bp050228w.

40. 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. doi: 10.1002/jps.24444.

41. Simonov V, Ivanov S, Smolov M, Abbasova S, Piskunov A, Poteryaev D. Control of therapeutic IgG antibodies galactosylation during cultivation process and its

impact on IgG1/FcγR interaction and ADCC activity. *Biologicals.* 2019 Mar;58:16-

21. doi: 10.1016/j.biologicals.2019.01.002.

42. Thomann M, Reckermann K, Reusch D, Prasser J, Tejada ML. Fc-

galactosylation modulates antibody-dependent cellular cytotoxicity of therapeutic

antibodies. *Mol Immunol*. 2016 May;73:69-75. doi:

10.1016/j.molimm.2016.03.002.

43. Thomann M, Schlothauer T, Dashivets T, Malik S, Avenal C, Bulau P, et al. In vitro glycoengineering of IgG1 and its effect on Fc receptor binding and ADCC activity. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134949. doi: 10.1371/journal.pone.0134949.
44. Damangel C, Duval D, Geahel I. The role of Dissolved oxygen in growth of animal cells. *Production of Biologicals from Animal Cells in Culture*. 1991:256-8. Doi: 10.1016/B978-0-7506-1103-9.50055-X.
45. Bogan JS, McKee AE, Lodish HF. Insulin-responsive compartments containing GLUT4 in 3T3-L1 and CHO cells: regulation by amino acid concentrations. *Mol Cell Biol*. 2001;21(14):4785-4806. doi:10.1128/MCB.21.14.4785-4806.2001.
46. Mulukutla BC, Khan S, Lange A, Hu WS. Glucose metabolism in mammalian cell culture: new insights for tweaking vintage pathways. *Trends Biotechnol*. 2010 Sep;28(9):476-84. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.06.005.
47. Templeton N, Dean J, Reddy P, Young JD. Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture. *Biotechnol Bioeng*. 2013 Jul;110(7):2013-24. doi: 10.1002/bit.24858.

48. Lowenstein J. *Methods in enzymology*, volume 13: citric acid cycle. 1st ed. Boston: Academic Press; 1969.
49. Kay J, Weitzman PD. *Krebs citric acid cycle: half a century and still turning*. 1st ed. London: Biochemical Society; 1987.
50. Lee SH, Kim DK, Seo YR, Woo KM, Kim CS, Cho MH. Nickel (II)-induced apoptosis and G2/M enrichment. *Exp Mol Med*. 1998;30:171-6. doi: 10.1038/emm.1998.25.
51. Shiao YH, Lee SH, Kasprzak KS. Cell cycle arrest, apoptosis and p53 expression in nickel(II) acetate-treated Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis*. 1998 Jul;19:1203-7. doi: 10.1093/carcin/19.7.1203.
52. Gramer MJ, Eckblad JJ, Donahue R, Brown J, Shultz C, Vickerman K, et al. Modulation of antibody galactosylation through feeding of uridine, manganese chloride, and galactose. *Biotechnol Bioeng*. 2011 Jul;108(7):1591-602. doi: 10.1002/bit.23075.
53. Williamson J, Miller J, McLaughlin J, Combs R, Chu C. Scale-dependent manganese leaching from stainless steel impacts terminal galactosylation in monoclonal antibodies. *Biotechnol Prog*. 2018 Oct;34(5):1290-7. doi: 10.1002/btpr.2662.

54. Prabhu A, Gadre R, Gadgil M. Zinc supplementation decreases galactosylation of recombinant IgG in CHO cells. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102:5989-99. doi: 10.1007/s00253-018-9064-8.
55. Chen P, Harcum SW. Effects of elevated ammonium on glycosylation gene expression in CHO cells. *Metab Eng*. 2006 Mar;8(2):123-32. doi: 10.1016/j.ymben.2005.10.002.
56. Rezaei MN, Aslankoochi E, Verstrepen KJ, Courtin CM. Contribution of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and the glyoxylate shunt in *Saccharomyces cerevisiae* to succinic acid production during dough fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2015 July;204(2):24-32. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.004.
57. Zhang X, Jiang R, Lin H, Xu S. Feeding tricarboxylic acid cycle intermediates improves lactate consumption and antibody production in Chinese hamster ovary cell cultures. 2020 Jul;36(4):2975. doi: 10.1002/btpr.2975.
58. Daisuke K, Hayato Y, Kunihiro M, Kiyofumi S, Takaya M, Yoshihiro S. Production of p-Aminobenzoic acid by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2014;78(2):350-7, doi:10.1080/09168451.2014.878222.



59. Nagarajan D, Sukumaran S, Deka G, Krishnamurthy K, Atreya HS, Chandra N.  
Design of a heme-binding peptide motif adopting a  $\beta$ -hairpin conformation.  
Journal of Biological Chemistry. 2018 June;293(24):9412-22. doi:  
10.1074/jbc.RA118.001768.
60. Radin NS, Ritterberg D, Shemin D. The rôle of glycine in the biosynthesis of  
heme. Biol Chem. 1950 Jun;184(2):745-53.
61. Xing Z, Kenty BM, Li ZJ, Lee SS. Scale-up analysis for a CHO cell culture  
process in large-scale bioreactors. Biotechnol Bioeng. 2009 Jul 1;103(4):733-46.  
doi: 10.1002/bit.22287.
62. Matsunaga N, Kano K, Maki Y, Dobashi T. Culture scale-up studies as seen from  
the viewpoint of oxygen supply and dissolved carbon dioxide stripping. J Biosci  
Bioeng. 2009 Apr;107(4):412-8. doi: 10.1016/j.jbiosc.2008.12.016.
63. Alhuthali S, Kotidis P, Kontoravdi C. Osmolality Effects on CHO Cell Growth, Cell  
Volume, Antibody Productivity and Glycosylation. International Journal of  
Molecular Sciences. 2021;22(7):3290. doi:10.3390/ijms22073290.
64. Takagi M, Hayashi H, Yoshida T. The effect of osmolarity on metabolism and  
morphology in adhesion and suspension chinese hamster ovary cells producing

tissue plasminogen activator. *Cytotechnology*. 2000;32:171-9.

doi:10.1023/A:1008171921282.

65. Goudar CT, Piret JM, Konstantinov KB. Estimating cell specific oxygen uptake and carbon dioxide production rates for mammalian cells in perfusion culture.

*Biotechnol Prog*. 2011;27(5):1347-57. doi: 10.1002/btpr.646.

66. Deshpande RR, Heinzle E. On-line oxygen uptake rate and culture viability measurement of animal cell culture using microplates with integrated oxygen

sensors. *Biotechnology Letters*. 2004;26:763–7.

doi:10.1023/B:BILE.0000024101.57683.6d.

67. Morciano G, Sarti AC, Marchi S, Missiroli S, Falzoni S, Raffaghello L, et al. Use of luciferase probes to measure ATP in living cells and animals. *Nat Protoc*. 2017

Aug;12(8):1542-1562. doi: 10.1038/nprot.2017.052.

## 9. 謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を受け賜りました秋田大学大学院理工学研究科 生物機能分子合成化学研究室 藤原憲秀先生に謹んで感謝の意を表します。

研究を実施するに当たり創薬等先端技術支援基盤プラットフォームを介しスクリーニング化合物を提供して下さった東京大学 小島宏建先生、大阪大学 土井健史先生、東北大学 土井隆行先生に深く感謝致します。

著者に秋田大学大学院理工学研究科 生物機能分子合成化学研究室への留学の機会を与えて下さると共に研究推進において終始御助言、御激励を賜りました第一三共株式会社バイオ医薬研究所 野中浩一所長に深く感謝致します。また、同じく御助力、御激励を賜りました第一三共株式会社バイオ医薬研究所第二グループの柿原博文グループ長、勝亦雄太研究員に深く感謝致します。

各大学とのスクリーニング化合物の授受に伴う契約締結にご協力下さった第一三共株式会社バイオ医薬研究所バイオ企画部 河原朗博氏、スクリーニング化合物の収集にご協力下さった推進調達部 片瀬正美氏に深く感謝致します。

最後に、本研究において終始理解を示してくれた妻ならびに息子に心から感謝致します。