

氏名（本籍）	安藝 祐一（埼玉県）
専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	理博甲第10号
学位授与の日付	令和 4年 3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理工学研究科 総合理工学専攻
学位論文題目 （英文）	低分子化合物によるチャイニーズハムスター卵巣細胞の抗体生産能力向上に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 藤原 憲秀 (副査) 教授 尾高 雅文 (副査) 教授 疋田 正喜 (副査) 教授 涌井 秀樹

論文内容の要旨

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モノクロナル抗体は、正常細胞を傷つけ難く癌や自己免疫疾患の治療法として注目を集めており、抗がん剤として Pembrolizumab、Nivolumab、Trastuzumab、自己免疫疾患の治療薬として Adalimumab、Infliximab などのモノクロナル抗体が既に実用化されている。また、モノクロナル抗体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るようになってきている。一般的にモノクロナル抗体は目的のモノクロナル抗体遺伝子を含むチャイニーズハムスター卵巣細胞により生産されており、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の開発、宿主や培地の改良、培養プロセスの最適化により従来リッターあたり数十ミリグラムであった生産性が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、チャイニーズハムスター卵巣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や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く、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。

チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いたモノクロナル抗体の生産性向上の研究として、効果的なベクターシステムの開発、宿主や培地の改良、培養プロセスの最適化を通じてリッターあたり数グラムの生産性が昨今では報告されている。しかし、低分子化合物をチャイニーズハムスター卵巣細胞の培養液に添加することにより生産性を向上させる例は、他の手法に比べて少なく幾つかの例が報告されているのみである。例えば、ジメチルスルホキシド、塩化リチウム、酪酸、吉草酸、バルプロ酸、フェノール系酸化防止剤、ヒポキサンチンとチミジン、CDK4/6 阻害剤は、適切な濃度で動物細胞培養に添加すると、目的たんぱく質の生産性を増強する知見が報告されている。さらに、3-メチルアデニンは小胞体ストレス応答経路をアップレギュレートすることで生産性を改善し、カスパーゼ阻害剤として作用する化合物コード 7312 はアポトーシスを抑制することで生産性を改善することが報告されている。低分子化合物を用いたモノクロナル抗体の生産性向上の研究が少ない理由は、多くの場合低分子化合物は毒性があると共に本分野はバイオと低分子化学の中間領域にあるため双方の専門性が問われるためと考えられる。世の中には医薬品として有効に利用される低分子化合物は無数にあることから探索研究により更に高活性で学術的・産業的に魅力的な低分子化合物を見出すことができる可能性があると考え、チャイニーズハムスター卵巣細胞からのモノクロナル抗体の生産性を向上させる低分子化合物の探索研究を実施する方針とした。

低分子化合物の探索研究の実施には、大規模な化合物ライブラリが必要であるため創薬化学研究のサポートを実施している創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) から約2.7万化合物を入手し、チャイニーズハムスター卵巣細胞の培養におけるモノクロナル抗体の生産性向上を評価したところ、4-(2,5-Dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)-*N*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) benzamide (MPPB) が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と細胞内のアデノシン三リン酸の濃度を上昇させることで単位細胞あたりのモノクロナル抗体の生産性を向上させることを見出した。先に例示した一部の低分子化合物群も細胞増殖を抑制すると共にモノクロナル抗体の生産性を向上させることを報告しているが、調査する限り低分子化合物を用いたグルコース消費量と細胞内のアデノシン三リン酸の濃度の上昇を報告している例は無く本研究での報告が初となる。また、MPPBはモノクロナル抗体の糖鎖品質に影響しガラクトシル化を低減する特性を有ることが分かった。MPPBの活性の更なる向上と活性中心を調査するためにMPPBの構造上の周辺化合物を用いた構造活性相関研究を実施した結果、MPPBの部分構造である2,5-dimethylpyrroleが、MPPBと同様に細胞増殖を抑制しグルコースの消費量と細胞内のアデノシン三リン酸の濃度を向上させたことから2,5-dimethylpyrroleがMPPBの活性中心であることを見出した。なお、2,5-dimethylpyrroleの周辺化合物は、2,5-dimethylpyrroleと同様に細胞増殖の抑制や生産性の向上を誘導するが、細胞生存率の顕著な低下を誘導することから2,5-dimethylpyrroleが最適構造であると結論した。また、MPPBと2,5-dimethylpyrroleを複数の細胞株に対

して適応した結果、必ずしもモノクロナル抗体濃度を向上させるわけではないが、細胞増殖を抑制し、グルコース消費量と細胞内のアデノシン三リン酸の濃度ならびに単位細胞あたりのモノクロナル抗体生産性を向上させる効果は共通であることが明らかになった。更にMPPBと2,5-dimethylpyrroleと類似の効果を示す塩化リチウムとの比較実験を実施した結果、MPPBと2,5-dimethylpyrroleは塩化リチウムよりも凡そ100倍薄い濃度で細胞に影響を及ぼすことが可能であり、少ない試薬使用量で培養時の重要パラメータである浸透圧に影響を与えずに細胞に作用可能な点で塩化リチウムよりも優れていた。

以上、著者はチャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた培養において低分子化合物の大規模スクリーニングを実施し、細胞増殖の抑制、グルコース消費の増強と細胞内のアデノシン三リン酸濃度の上昇を誘導し単位細胞辺りのモノクロナル抗体の生産性を向上させる新規低分子化合物であるMPPBならびにMPPBの部分構造である2,5-dimethylpyrroleを見出すことに成功した。

論文審査結果の要旨

提出された博士論文、博士論文要旨および論文目録について、藤原憲秀審査委員会主査、尾高雅文審査委員、疋田正喜審査委員、涌井秀樹審査委員により構成される審査委員会において審査し、不備がないことを確認した。記載内容は適正であり、査読のある学術誌に第一著者として投稿された論文が受理されていることを確認し、書類審査は合格とした。

申請者の安藝祐一氏の著した博士論文の概要は次のとおりである。

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、中でも低分子医薬品よりも標的選択的に作用するモノクロナル抗体は、正常細胞を傷つけ難く癌や自己免疫疾患の治療法として注目を集めており、抗がん剤や自己免疫疾患の治療薬としてモノクロナル抗体(mAb)が既に実用化されている。一方、汎用化につれmAbの増産と低コスト化が求められるている。一般的にmAbはチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞により生産され、昨今では数グラムレベルの生産性に高められているものの、その製造費用はいまだ高額である。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は更なるmAbの生産性の向上が求められている。

CHO細胞を用いたmAbの生産性向上の研究として、ベクターシステムの開発、宿主や培地の改良、培養プロセスの最適化が報告されている。しかし、低分子化合物をCHO細胞の培養液に添加することで生産性を向上させる例は、少数の例が報告されているのみである。一方、医薬品として有効利用される低分子化合物は無数にあることから、探索研究により更に高活性で学術的・産業的に魅力的な低分子化合物を見出せる可能性は高い。そこで、本論文研究では、CHO細胞のmAbの生産性を向上させる新規低分子化合物の探索研究を実施した。本論文は以下の6章で構成されている。

第1章では、抗体医薬品の背景と低分子が抗体生産性を向上させる例について概説し、

本研究の目的を述べている。

第2章では、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) から約 2.7 万化合物を入手し、CHO 細胞の培養における mAb の生産性向上を評価し、4-(2,5-Dimethyl-1*H*-pyrrol-1-yl)-*N*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) benzamide (MPPB) を有望な候補として選定した経緯を述べている。

第3章では、MPPB の特性評価としてバッチ培養とフェドバッチ培養を実施した経緯を述べている。評価の結果、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と細胞内の ATP の濃度を上昇させることで単位細胞あたりの mAb の生産性を向上させることを示している。さらに、細胞周期を G2/M 期に偏らせること、mAb の糖鎖品質に影響しガラクトシル化を低減する特性を持つことを述べている。

第4章では、MPPB の構造活性相関研究に研究展開し、MPPB の部分構造である 2,5-dimethylpyrrole (2,5-DP) が、MPPB と同様に細胞増殖を抑制しグルコースの消費量と細胞内の ATP の濃度を向上させる効果があることを述べている。よって、2,5-DP が MPPB の活性中心であることが結論付けられた。

第5章では、異なるタンパクを生産する CHO 細胞間において、その生産性に及ぼす MPPB と 2,5-DP の効果の違いに研究を展開している。効果は細胞種に依存しないことが結論付けられた。また、同様の効果を示すとされている LiCl と比較して、MPPB と 2,5-DP の優位性を示している。

第6章では、全体の研究成果の意義と今後の展望をまとめている。

全体で 67 編の参考文献が引用されており、関連分野の重要文献の内容が解説されている。

以上のように、本論文では、これまで例の少なかった低分子による CHO 細胞による抗体生産能力の向上のため、医薬品関連化合物ライブラリを用いた大規模スクリーニングを実施し、単位細胞あたりの抗体生産量を上昇させる MPPB を見出した。この抗体生産量の増加には、MPPB の細胞増殖抑制とグルコース消費量の向上による ATP 量の増加が寄与することも見出しており、抗体生産細胞の能力向上に新たな指針を示す結果として高く評価できる。博士 (理学) の学位論文として、十分に価値があるものと認められる。