

---

PROCESS DEVELOPMENT  
FOR EFFICIENT PRODUCTION  
OF  
ANTIBODIES WITH HIGH  
ANTIBODY-DEPENDENT CELLULAR  
CYTOTOXICITY ACTIVITY  
FROM A YB2/0 CELL LINE

高い細胞傷害活性を有する抗体医薬品  
の YB2/0 細胞を用いた  
効率的な物質生産研究

---

2011

平成 23 年度

BY

YOSHINOBU KONNO

今野 由信

DOCTOR THESIS

GUNMA UNIVERSITY

群馬大学大学院 工学研究科

## ABSTRACT

---

The contribution of biopharmaceutical industries to general healthcare is rapidly increasing with over 165 products having been approved globally since 1982. Within the therapeutic applications of biopharmaceuticals, monoclonal antibodies (MAbs) are of growing interest. Recently, more than twenty therapeutic MAbs and related proteins have been launched in the market. This situation is a double-edged sword because it leads to pressure on pharmaceutical economy. Minimizing the cost of goods (COGS) and maximizing antibody activity are therefore active areas of research in the development of MAbs for therapeutic use.

We have screened several enhancers of specific MAb production rate (SPR) using the rat hybridoma YB2/0 cell line and found that coenzyme-Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) is a promising enhancer candidate. CoQ<sub>10</sub> is well known as a strong antioxidant in the respiratory chain and is used for healthcare and other applications. Because CoQ<sub>10</sub> is negligibly water soluble, most studies are limited by low concentrations. We added CoQ<sub>10</sub> to a culture media using dispersion of nano-particles (Q-Media) at several concentrations and conducted a fed-batch culture. Although the Q-Media had no effect on cumulative viable cell density, it enhanced the SPR by 66%. In addition, the Q-Media had no effect on the binding or cytotoxic activity of MAbs. Q-Media also enhanced SPR with CHO and NS0 cell lines by 30%. On the other hand, the Q-Media did not alter the concentration of the oxidative stress marker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the culture supernatant. Furthermore, Q-Media decreased the ratio of lactate production to glucose consumption only slightly, and CoQ<sub>10</sub> (232 μM) elevated intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, as did ATP (10 μM). These observations suggest that CoQ<sub>10</sub> serves as a powerful aid in the production of MAbs by enhancing SPR without changing the character of cell growth, or adversely affecting quality or biological activity of MAbs.

Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is dependent on the fucose content of oligosaccharides bound to MAbs. As MAbs with a low fucose content exhibit high ADCC activity, it is important to control the defucosylation levels (deFuc%) of MAbs and to analyze the factors that affect deFuc%. In this study, we observed that the deFuc% was inversely related to

culture medium osmolality for the MAbs produced in the YB2/0 cell line, with the  $r^2$  value as high as 0.92. Moreover, deFuc% exhibited the same correlation irrespective of the type of compound used for regulating osmolality (NaCl, KCl, fucose, fructose, creatine, or mannitol) or culture scale (1–400 L). We succeeded in controlling MAb deFuc% by maintaining a constant medium osmolality constant in both perfusion and fed-batch cultures. The regulation of medium osmolality with glucose is, however, sufficient for designing the deFuc% desired for efficacious ADCC in YB2/0 cell culture. In agreement with these observations, real-time PCR analyses revealed decreased transcription of genes involved in the glycolysis, GDP-fucose supply, and fucose transfer.

In this study, both methods to enhance the efficiency of the production are achieved as an extension to existing processes. The present method to control deFuc% with medium osmolality will open the way to use those mammalian cells, for glycoprotein production, that could not be employed because of unwantedly high and/or uncontrollable fucose content in the oligosaccharides attached to the protein. These findings will enable the use of the defucosylated IgG1 at lower doses with no reduction in efficacy without restart such as changing the cell bank.

## 目次

---

Abstract.....	i
目次.....	iii
略語表.....	vi
第1章 緒論.....	1
1.1.    バイオ医薬品の進展.....	1
1.2.    生産における抗体医薬の課題.....	1
1.3.    既存の報告.....	3
1.4.    本研究の目的と内容.....	4
第2章 生産性増強因子の探索.....	5
2.1.    緒言.....	5
2.2.    試料と方法.....	10
2.2.1.    試薬.....	10
2.2.2.    細胞.....	10
2.2.3.    細胞培養.....	10
2.2.4.    分析方法.....	11
2.2.5.    細胞内カルシウム濃度.....	11
2.2.6.    ADCC 活性.....	11
2.2.7.    各計算式.....	12
2.3.    結果と考察.....	13
2.3.1.    スクリーニング系の選択.....	13
2.3.2.    スクリーニング供試薬剤の選定.....	13

2.3.3.	CoQ <sub>10</sub> 溶解法の検討 .....	15
2.3.4.	CoQ <sub>10</sub> 単独効果の検証 .....	15
2.3.5.	SANOMIT <sup>®</sup> Q <sub>10</sub> .....	16
2.3.6.	活性酸素傷害指標となる 8-ヒドロキシデオキシグアノシン .....	18
2.3.7.	CoQ <sub>10</sub> 添加時における 8-ヒドロキシデオキシグアノシン濃度測定 .....	19
2.3.8.	中央代謝への影響 .....	20
2.3.9.	CoQ <sub>10</sub> 添加によるカルシウムの動員 .....	22
2.3.10.	CoQ <sub>10</sub> 添加培養による生産物の ADCC 活性 .....	22
2.3.11.	他細胞 (NS0, CHO 細胞) への効果 .....	23
2.4.	小括 .....	24
第 3 章 糖鎖制御 .....		25
3.1.	緒言 .....	25
3.2.	試料 .....	29
3.2.1.	使用細胞株 .....	29
3.2.2.	使用原料 .....	29
3.3.	方法 .....	29
3.3.1.	培養装置 .....	29
3.3.2.	分析方法 .....	29
3.3.3.	培養方法 .....	31
3.3.4.	各計算式 .....	31
3.3.5.	糖鎖制御フェドバッチ培養 .....	31
3.4.	結果と考察 .....	32
3.4.1.	初発培地の浸透圧による抗体糖鎖フコース非含量 (deFuc%) への影響	32
3.4.2.	フェドバッチ途中での希釈の deFuc% への影響 .....	33

3.4.3.	他細胞（NS0，SP2/0細胞）での deFuc%への影響 .....	35
3.4.4.	灌流（Perfusion）培養を用いた制御範囲の検討.....	36
3.4.5.	種々の調圧剤による deFuc%への影響 .....	38
3.4.6.	計算法の見直し.....	39
3.4.7.	各種培養データのプロット.....	40
3.4.8.	YB2/0細胞フェドバッチ培養の RT-PCR 分析 .....	41
3.4.9.	培地浸透圧が及ぼす GDP-フコース代謝経路の発現解析 .....	43
3.4.10.	糖鎖制御 Fed-batch 培養初期検討.....	44
3.5.	小括.....	47
第4章	総括 .....	48
第5章	本論文に関する報文と特許出願 .....	50
5.1.	関連論文.....	50
5.2.	関連特許.....	50
5.3.	学会発表.....	51
5.4.	参考論文.....	51
第6章	謝辞 .....	52
第7章	参考文献 .....	53

## 略語表

---

MAb	抗モノクローナル抗体
SPR	抗体比生産速度, Specific antibody Production Rate (mab-pg/cell/d), $Q_{\text{mab}}$
ADCC	細胞傷害, Antibody dependent cellular cytotoxicity
deFuc%	抗体糖鎖中フコース不含率, %
CCD	累積細胞密度, Cumulative cell density, (cells×d/mL)
CoQ <sub>10</sub>	コエンザイムQ <sub>10</sub> , Coenzyme-Q <sub>10</sub>
8OHdG	8-ヒドロキシデオキシグアノシン, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
dCO <sub>2</sub>	溶存炭酸ガス, dissolved carbon dioxide
DOE	実験計画法, design of experiment
$\beta$ -CD	$\beta$ -シクロデキストリン, $\beta$ -Cyclodextrin,
CLC	Chemically defined Lipid Concentrate, Lifetechnologies社
HDLC	High Density Lipid Concentrate, Lifetechnologies社
Glc	グルコース, Glucose
IMDM	Iscove Modified Dulbecco's Medium,
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
$\alpha$ -MEM	$\alpha$ - Modified Eagle's Medium
$Q_{\text{glc}}$	グルコース比消費速度, (glc-mg/cell/d)
$Q_{\text{lac}}$	乳酸比生産速度, (lac-mg/cell/d)
L/G	グルコース比消費速度と乳酸比生産速度の比, $Q_{\text{lac}}/Q_{\text{glc}}$
T <sub>3</sub>	トリヨードサイロニン, 3,3',5-triiodo-L-Thyronine(-).3
MTX	メトトキセレート, Methotrexate
<i>FUT8</i>	alpha-1,6-fucosyltransferase gene
<i>GMD</i>	GDP-mannose 4,6-dehydratase gene
QbD	Quality by design

## 第 1 章 緒論

---

### 1.1. バイオ医薬品の進展

---

バイオ医薬品の開発の成功は広く医療への貢献を果たしてきた。その成功は 1982 年に開発されたインスリンなど主にサイトカインなどのタンパク製剤に代表される第一世代バイオ医薬と 1990 年代後半より成功を示す抗体医薬を中心とした第二世代に分けることができる (Walsh, 2006)。第二世代の生産物である抗体は、マウス抗体からヒトへの抗原性が低いマウス/ヒト型キメラ抗体、ヒト化あるいはヒト型抗体へと抗体工学成功による副作用の低減技術の進展により 29 品目を超える新薬として貢献するようになった。2008 年には、実に 5 品目がグローバル売上高 40 億ドルを越える上位 15 品目に入り、患者さんの生活改善への貢献の大きさを示している。さらに、400 を超える前臨床試験が進行中とされ医療貢献への期待は高まるばかりである (Beck et al., 2008; Molowa, 2001)。動物細胞による物質生産は 1962 年の Capstick らによる baby hamster kidney 細胞を用いたワクチン製造にさかのぼり (Capstick et al., 1965)、微生物や酵母など他の宿主では達成できていないヒト型に酷似した糖鎖を製造する唯一の産業方法として用いられてきた。遺伝子組み換え技術の完成により目標生産物はワクチンから、酵素、サイトカインなどの糖タンパク、抗体へと多様化し発展してきた (Arathoon, Birch, 1986)。動物工場を利用した製造法などの開発も進み血液由来蛋白であるアンチトロンビンが上市され今後が期待されるが (Yann Echelard, 2006)、なおも動物細胞による物質生産は抗体医薬など産業の中心にある。動物細胞培養工程には、かつては血清や Bovine Serum Albumin, Transferrin など動物由来原料が含有されていたが、動物由来原料の排除による改良プロセスの構築によって、より安全性の高い生産を可能にしてきた。

### 1.2. 生産における抗体医薬の課題

---

第一世代バイオ医薬品に対し、第二世代のバイオ医薬品である抗体医薬品は、一般にサイトカインに比べて要求される投与量が多いことから、以下のような課題が生じている。



- ・ 製造設備建設期間と開発進展時期の不一致
- ・ 要求生産量の安定充足
- ・ 製造コスト低減の必要性
- ・ 医療経済高騰の脅威

一般に、医薬品の投与量決定は臨床試験の Phase II 以降となる。一方で、生産設備の建設期間は設計から実稼働まで 3～5 年を要するとされ、投与量の予測が困難な Phase I の段階で設備化の着手（投資）判断を迫られることになる (Steinmeyer, McCormick, 2008)。開発中抗体の適応症に応じた市場見込みから予測計算せざるを得ず、要求量充足に対して過大／過少となる設備設計のリスクを増大させている。また、多様な抗体医薬品の成功は生産要求量の予測と対応の困難さを示している。Enbrel<sup>®</sup>はその要求量を満たすことができなかった (Farid et al., 2007)。Actemura<sup>®</sup>は必要量の増大からグループ会社への委託製造を進めた。他のタンパク医薬品の多様性に対して、抗体医薬はその汎用性から設備兼用のマルチプラント化の利点が大きく取り上げられてきた。しかし、年間必要量の差異は 20 kg から 1,200 kg と広範囲にわたっており、50 倍以上におよぶ生産必要量の相違は物理的な設計にも、経済的にも難題を突き付けている (Kelley, 2009)。

モノクローナル抗体を用いた治療では、高価な抗体を多量に投与する必要があるため、医療費の削減のために大きく 2 つの試みがなされている。一つは投与量を低減するために薬効を高めること、もう一つは生産性の改良にある。生産性の向上は、要求バッチ数の低減によるコスト面での貢献はもちろん、容量低減による生産設備を確保するリスクの低減、設備投資額の低減による投資リスクの低減など様々な面での貢献が期待できる。これらの問題を解消する手法としてかねてより、トランスジェニックヤギ、ウシ、タバコ、トウモロコシ、大腸菌、酵母など新たな生産系の研究が盛んに実施され (Yin et al., 2007)、今後の成果が期待されている。

抗体医薬の薬効は、標的抗原特異的な結合活性とエフェクター活性と呼ばれる抗体の生物活性によって発揮されている (Mori et al., 2007)。抗体医薬は Fc と呼ばれる抗体定常領域を介して、抗体依存性細胞傷害活性 (antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC) や補体依存性細胞傷害活性 (complement-dependent cytotoxicity; CDC) あるいはアポトーシスの直接誘導といったエフェクター活性を発揮することができ

る。現在、抗体医薬の薬効を高める研究としてエフェクター活性を向上させる研究が盛んに行われている。ADCC 活性とは、標的細胞に結合した抗体が NK 細胞やマクロファージなどのエフェクター細胞上の Fc 受容体と結合することで、抗体依存的に誘導される標的細胞傷害活性である。抗体医薬の薬効発現のメカニズムとして、ADCC 活性や CDC 活性あるいはアポトーシスの直接誘導といったエフェクター活性の重要性が古くから指摘されているが、臨床上的メカニズムが最も重要なのかは明らかとなっていなかった。非ホジキンリンパ腫及び乳癌の患者さんの Fc 受容体多型解析が行われ、リツキシマブ及びトラスツズマブいずれにおいても、その主たる抗腫瘍メカニズムの一つは ADCC 活性であることが明らかにされてきている。抗体医薬の ADCC 活性を増強させる手段としては 2 つのアプローチが知られている。その一つは、抗体の Fc 領域のアミノ酸配列を改変するものであり (Shields et al., 2002)、もう一つのアプローチは抗体の Fc 領域に結合している糖鎖の構造を制御するものである (Shinkawa et al., 2003)。抗体糖鎖の微細な構造が ADCC 活性に及ぼす影響については長い間議論があったが、筆者の所属する会社及び Genentech 社のグループが、Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンへのフコースの付加修飾こそが抗体の ADCC 活性に最も大きな影響を与えることを明らかにした。抗体 Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンからフコース残基を除去すると Fc 受容体 IIIa に対する親和性が上がり ADCC 活性が 100 倍以上と劇的に向上する (Shinkawa et al., 2003)。この際、抗原結合活性や CDC 活性には変化は観察されない。フコース非修飾抗体は低い用量で高いエフェクター活性を示す能力を有しており、癌抗原を低いレベルでしか発現していない癌細胞に対しても高い殺細胞活性を示し、治験でもその効果が示され始めている (Satoh, 2006)。なお、糖タンパクの糖鎖構造は、生産される宿主に依存するとされる。

以上、複数の側面から、高い活性を有する抗体と、動物細胞培養における抗体の生産性は非常に注目されている。

### 1.3. 既存の報告

---

これまでに上市された抗体医薬を発現する宿主は、CHO 細胞、NSO 細胞、SP2/0 細胞に限定される。過去には、YB2/0 細胞が CAMPATH-1H<sup>®</sup>の開発初期に用いられていたが、その後 CHO 細胞へ切り替えられた。YB2/0 細胞の培養方法に関する報告は、Lonza 社の出

願などにみられるが(Kenten, Boss, 1986), その後工業スケールに関する報告はみられていない. 新川らによる高い活性を有する抗体産生能力が見出される前に CHO 細胞が事実上の標準手法となっていた. CHO 細胞を宿主とした製造は, グローバルでの上市 29 品目中 14 品目を数えるに至っており(Michel Chartrain, Chu, 2008), 付随する技術, 安全性実績からこの傾向は進むと考えられる.

YB2/0 細胞は, LOVAIN (LOU) ラット細胞と A0 ラット細胞の融合ハイブリッドミエローマ細胞の非抗体生産株 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 である(Kilmartin et al., 1982; Millistein, 1981). ATCC(American Type Culture Collection)では CRL-1662 として登録されている. 同様に垂株として, YB2/3.0Ag30 が Y0 細胞として ECACC (European culture Collection)に No.85110501 として登録されている(Keen, 1995). しかし, この細胞の特性解析の情報は限られている(Gao et al., 1992). また, 組換え蛋白の発現方法としては 1986 年の Kenten らの出願(Kenten, Boss, 1986), 設楽らのベクター系が知られており(Shitara et al., 1994), 開発化合物としては先述の CAMPATH-1H<sup>®</sup>が知られる(Lifely et al., 1995).

#### 1.4. 本研究の目的と内容

---

本研究では, 有用物質を生産する動物細胞宿主として, 産生抗体糖鎖中のフコース含量が低いこと, すなわち ADCC 活性が高い抗体を産生することが分った YB2/0 細胞をモデルツールに効率的なプロセス開発の可能性を検討した.

本論文の概要は, 以下の通り 2 章からなる. 第 2 章では, 細胞あたりの生産性を向上する物質の培地添加物を検討した. 第 3 章では, 安定した医薬品供給のために必須となる活性安定性のために, 高活性に寄与する抗体糖鎖中のフコース含量の制御因子を抽出し, 制御法の構築を検討した. また, その原因について考察した.

## 第 2 章 生産性増強因子の探索

---

### 2.1. 緒言

---

従来の組換えタンパク製剤に比較して、抗体の投与量は著しく多量である。また、低分子に対して高額な製造コストから、29 品目を超える抗体医薬の成功は(Beck et al., 2008), 同時に医療経済への負荷問題を引き起こしている。これら問題の解消方法として、①生産性の増強, ②抗体の薬効の増強が試みられている。抗体の主たる製造手段である動物細胞培養における生産性は非常に注目されている。

これらの問題を解消する手法としてかねてより、トランスジェニックヤギ(Adiguzel et al., 2009), ウシ, タバコ, トウモロコシ, 大腸菌(Simmons et al., 2002), 酵母など新たな生産系の研究が盛んに実施され, 今後の成果が期待されている。一方で, これらの新技術は未だ上市品目が限定されており規制対応などの面で未だ不安を残す。しかし, これを解消するような報告が 2003 年 5 月に発表された(Varma, 2003)。5 g/L の生産性を示す培養データが GS/NS0 細胞の系で MedImmune 社によって構築された。示されたデータから SPR は 70 mab-pg/cell/d と推算された。2000 年当時には目標力価であった g/L も, 現在では数 g/L が実用目標となっている。逆に, Genentech 社の *E. coli* での抗体生産の報告が g/L レベルであることを考えると(Simmons et al., 2002), 規制や既設の設備など現実的な視点からは動物細胞培養の工程をブラッシュアップする方針の有用性がうかがえる。

生産性の改善はこれまで多く取り組まれてきた。その方法には, 遺伝的改変, クローン選択手法, 培地の最適化, 培養槽工学的なアプローチが含まれ(Takenouchi, Sugahara, 2003), 生産性増強因子の添加はその一つである。一方, 医薬品の開発において, 創薬から上市までは約 12 年かかるとされ, 引き続き開発期間の長期化が課題となっている(Steinmeyer, McCormick, 2008)。技術の進歩が激しいバイオ医薬品の開発において長期間にわたって一貫して同じ技術を管理すること, それに対して新しい技術を取り入れた際の生産物の同等同質性を管理することの重要性が高まっている。開発期間を通じた品質特性変化のリスクを排除するために一度構築したバンクの変更は極力避ける傾向にあ

る。このような方針を持つ場合、生産性増強因子の添加が可能にするバンクの変更をと  
もなわず開発のフェーズに応じて生産性を向上する利点が合致する。生産性増強因子に  
は次のような要求に満たす必要がある。

- (a) 作業場、患者さんに安全であること、
- (b) 最終製品の品質に影響しないこと、
- (c) コストに見合うこと、
- (d) 扱いが容易であること、
- (e) 工程が堅牢であること。

これまで、酪酸ナトリウム(Mimura et al., 2001)、キヤスパーゼ阻害剤(Arden et al.,  
2007)、核酸(Carvalho et al., 2003)、リポポリサッカライド(Martin-Lopez et al.,  
2007)、リノレイン酸(Butler et al., 1999)、Dimethyl sulfoxide (Ling et al., 2003;  
Tsao et al., 2001)、スペルミン(Miyazaki et al., 1998)、セリシン(Terada et al., 2002)、  
レチノイン酸(Inoue et al., 2000)、糖源(Coroadinha et al., 2006a)、バルプロ酸  
(Backliwal et al., 2008)など (Table 1) いくつかの生産性増強因子が報告されてい  
る。その効果は抗体生産量が g/L を下回るような低生産性ケースでコスト (yen/g) へ  
の寄与が高い(Sommerfeld, Strube, 2005)。

Table 1. Reported enhancers of protein production in animal cell lines

Enhancer	Range/ Optimal	Product	Effect	Cell line	Reference
AMP	1 mM	Human placental alkaline phosphatase enzyme (SEAP)	3-fold in SPR	CHO-K1	(Carvalho et al., 2003)
/ nucleotides, nucleosides, and bases	1 mM	Factor VII	2-fold in SPR	CHO-K1	
	0.3 mM	Factor VII	2.5-fold in SPR	BHK	
Carnosine	20 mM	Telomerized cells	2.5-fold in total number cells	Telomerized cells	(Yegorov et al., 2007)
Chemical caspase inhibitors	5-50 $\mu$ M / 5 $\mu$ M	MAb IgG	1.2-fold in MAb titer	CHO-K1, HEK-293	(Arden et al., 2007)
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	0-1.5% / 0.2% (v/v)	MAB	2-fold in SPR	Hybridoma clone 19	(Ling et al., 2003)
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	0-5 mM / 1 mM	Adenoviral vector	3-fold in Virus production	HEK293	(Tsao et al., 2001)
Sodium butyrate,	0-5 mM / 0.5 mM		1.5-fold		
Ethyl alcohol,	0-200 mM / 100 mM		1.8-fold		
N-acetyl-L-cysteine	0-5 mM / 2.5 mM		1.8-fold		
Glycerol	0-2.0% / 1%	Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)	1.4-fold in titer	CHO	(Liu, Chen, 2007)
Lactate dehydrogenase (LDH)	320 $\mu$ g/mL	IgM	12.4-fold	Human-human hybridoma HB4C5	(Takenouchi, Sugahara, 2003)
Linoleic acid	25,50 $\mu$ M / 25 $\mu$ M	MAB (IgG1)	-	Hybridoma (CC9C10)	(Butler et al., 1999)
Long <sup>TM</sup> R3 IGF-I	-	MAB	1.2-fold in titer	CHO	(Kim et al., 2005)
Triiodothyronine (T <sub>3</sub> )	-		1.2-fold in titer		
Lipopolysaccharide (LPS)	60 pg cell <sup>-1</sup>	IgG2a to human Immunodeficiency virus (HIV) glycoprotein 120 (gp120).	3-fold in SPR	Mouse-mouse B cell hybridoma line (CD40 and CD19-deficient expression)	(Martin-Lopez et al., 2007)

Pyruvate	0.02 M	Anti-ribonuclease A Ab	1.4-fold in SPR	Hybridoma 3A21	(Omasa et al., 2010)
Malate	0.005 M		1.1-fold in SPR		
Citrate	0.05 M		1.1-fold in SPR		
Rapamycin	100 nM	MAB	0.25 to 0.56 g/L, 1.24-fold	Hybridomas CRL 1606	(Balcarcel, Stephanopoulos, 2001)
Retinoic acid	10 <sup>-7</sup> M	IgG	8-fold	Human-human hybridoma BD9	(Inoue et al., 2000)
Sericin	0.01%-0.3% / 0.1%	-	-	Hybridoma	(Terada et al., 2002)
Small molecule enhancers	0.5 mM	MAB	1.6-fold	CHO	(Allen et al., 2008)
Sodium butyrate (NaBu) + <i>N</i> -acetylcystein (NAC)	1 mM NaBu and 8 mM NAC	IFN-beta	2-fold	CHO	(Oh et al., 2005)
Sodium butyrate	0-5 mM / 2 mM	Mouse/human chimeric IgG3	2-4-fold	CHO-K1	(Mimura et al., 2001)
Sodium butyrate	5 mM	Humanized IgG	1-4-fold	CHO, 9 clones	(Jiang, Sharfstein, 2008)
Spermine	7.3 mM	IgM, IgG	6-fold	Human-human hybridoma, HB4C5	(Miyazaki et al., 1998)
Sugar source	Glc 25-140 mM	MoMLV-derived recombinant retroviral vectors	14-fold	Retroviral producer cell line	(Coroadinha et al., 2006a)
glucose, galactose, sorbitol, and fructose	Frc 83-140 mM				
Valproic Acid	100 μM-20 mM / 500 μM	MAB	4-fold 1.5-fold	CHO-DG44	(Backliwal et al., 2008)
Valproic Acid	100 μM	MAB	3-fold	CHO	(Konno et al., 2006)
Vitamin A acetate	1 μg/L	Human MAB AE6F4	0.9-2.9-fold	Hybridoma	(Inoue et al., 1999)

∞

コエンザイム Q は酵母, 植物そして動物と広く存在する生合成キノンであり, ユビキタスに存在することからユビキノンと呼ばれる. 人間を含む高等生物では側鎖 10 のイソプレノイドを持ちコエンザイム  $Q_{10}$  と呼ばれる (Hathcock, Shao, 2006). あるいはユビキノン  $CoQ_{10}$  と呼ばれ, 健康飲料などの生産物に使われている (Kitano et al., 2004; Ochiai et al., 2007).  $CoQ_{10}$  はミトコンドリア内膜に存在する脂溶性物質で, 強力な抗酸化剤として知られ電子伝達鎖の一機能を有し ATP の合成に必須であること, 年齢とともに失われることからサプリメントとして用いられる (Turunen et al., 2004). 細胞のエネルギー代謝のサポートを期待する栄養補助剤として知られる (Mancuso M, 2010). 糖尿病 (Hodgson et al., 2002), 心筋梗塞 (Singh et al., 1998; Soja, Mortensen, 1997), パーキンソン病 (Shults et al., 2004), 肺がん (Portakal et al., 2000) などの臨床試験が行われている. また, 術後の補助剤 (Chello et al., 1996; Hathcock, Shao, 2006) としても使用されている.

細胞培養でもいくつかの細胞に供され, HeLa 細胞では細胞の成育を阻害しアポトーシスを誘導した (Gorelick et al., 2004). その一方で, ヒト急性リンパ性白血病細胞では Caspase-3 の活性を阻害しアポトーシスを減少することが知られる (Navas et al., 2002). このように未だ  $CoQ_{10}$  のアポトーシスへの影響は定かでないものの, マウス線維芽細胞, 牛胚細胞培養を含む細胞で成育促進剤として知られる (Stojkovic et al., 1999; Sun et al., 1992; 1995). しかし, これまで抗体生産性と直接結びつける報告は無いことから,  $CoQ_{10}$  の YB2/0 細胞, CHO 細胞, NS0 細胞への応用を試みた.



## 2.2. 試料と方法

---

### 2.2.1. 試薬

---

CoQ<sub>10</sub> と Tween80 を重量比率 1 : 2 でエタノールを用いて完全溶解後、エタノールを揮発させた。この時、エタノールの気化熱により混合物が冷えると CoQ<sub>10</sub> の再析出の可能性があるので加熱しながらエタノールを揮発させた。得られた混合物に温水を添加し、得た黄色透明な液体を 0.2 μm のフィルターで無菌ろ過して CoQ<sub>10</sub>-Tween80 のストック溶液とした。SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub> (MSE, Hamburg, Germany) を生産性増強サプリメントとして選択し、SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub> を培地に添加した。CoQ<sub>10</sub> は、強い難水溶性により水系での使用が制限されている。SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub> は CoQ<sub>10</sub> 以外にアルコール、グリセロール、レシチン、水を含み、ヨーロッパを中心に販売される健康食品である。この製品はナノエマルジョン化技術によって 50 nm 以下の粒径に分散安定化されていることから他の CoQ<sub>10</sub> 化合物よりも操作性に優れている。SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub> を加えた培地を本論文では Q-Media と表記した。その他の生産性向上因子候補として、グルタチオン、α-トコフェロール、アスコルビン酸、2-メルカプトエタノール p-ヒドロキシ安息香酸 (Sigma Chemical. Co., St. Louis, MO) などを試した。詳細は後述する結果の項に記した。

### 2.2.2. 細胞

---

本検討には以下の細胞を供した。YB2/0 (ラット-ラットハイブリドーマ, ATCC CRL-1662) 由来, マウス/ヒトキメラ型 IgG1 抗体生産株. Columbia University, NY の Dr. Lawrence Chasin, より得た CHO/ DG44 株 (Urlaub G, 1985) 由来, マウス/ヒトキメラ型 IgG1 抗体生産株. NS0 (理研セルバンク: RCB0213) 由来, マウス/ヒトキメラ型 IgG1 抗体生産株.

### 2.2.3. 細胞培養

---

接着依存性の NS0 株は T-225 cm<sup>2</sup> フラスコ (旭硝子, 東京, 日本) にて培養した。浮遊性の CHO 細胞と YB2/0 細胞は 250 mL 容量の三角フラスコ (Corning, NY, USA), を CO<sub>2</sub> インキュベーター (タバイエスペック) 内に設置した回転振とう機 (タイテック, 東京,

日本) , または 1-L Bioreactors (ABLE, 東京, 日本) を用いて培養した. Q-Media は ExCell™302 (SAFC-bioscience, St Louis, MO, USA) と RPMI-1640 Medium と Hybridoma-SFM, そして CD-Hybridoma (Lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて調製した. H-SFM, CD-Hybridoma 培地は使用に際しては High Density Lipid Concentrate (HDLC, Lifetechnologies 社) を 0.4% (v/v) 添加した. 播種は  $2 \times 10^5$  cells/mL 以上の密度で行い, 37°C で細胞衰退期まで培養を実施した. リアクター培養の際は pH 7.1 に CO<sub>2</sub> ガス, または 1 mM の Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> アルカリ溶液で制御した. 同様に溶存酸素 (DO) は, 酸素通気で 50% に制御した.

---

#### 2.2.4. 分析方法

---

細胞密度および生存は, 0.4% トリパンブルーを用いた色素排除法を用いた CEDEX™ (Innovatis AG, Bielefeld, Germany) によって測定した. 抗体濃度は, HPLC ProteinA 法を用いた. グルコース, 乳酸は, 固定化酵素電極法 YSI2700 SELECT (Yellow Springs Inc., OH, USA) を用いてオフライン分析を行った. 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) 濃度は, ELISA (8-OHdG check, Japan Institute for the control of aging, Shizuoka, Japan) を用いて測定した.

---

#### 2.2.5. 細胞内カルシウム濃度

---

細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) は, fura-2 を用いた蛍光測定法により測定した. 細胞懸濁を fura-2/acetoxymethyl ester (3 μM) を含む液基本培地で 40 分, 37°C 攪拌しながら培養した. Locke's solution で細胞を洗浄し室温で保存した. Sulfinpyrazone (250 μM) を反応停止液として添加した. 測定は, 340, 380 nm と 500 nm の 2 波長励起 1 波長蛍光で測定した (Park et al., 2001).

---

#### 2.2.6. ADCC 活性

---

細胞傷害性活性 (ADCC) は, <sup>51</sup>Cr を用いて測定した (Shinkawa et al., 2003).

---

### 2.2.7. 各計算式

---

生存率：生細胞数/総細胞数×100 (%)

CCD：cumulative cell density：累積細胞密度 (cells/mL×d)

$$\text{CCD} = \Sigma[\text{viable cells}^2 + \text{viable cells}^1 (\text{cells/mL})] \times [\text{time}^2 - \text{time}^1 (\text{d})]/2$$

細胞密度の時間積分であるが、一日一回のサンプリングを実施しているため細胞密度×1日の総和で概算した。

SPR：Specific Monoclonal antibody Production Rate，比抗体生産速度，

$$\text{SPR} = \text{抗体濃度} / \text{CCD} (\text{mab-pg/cell/d})$$

## 2.3. 結果と考察

---

### 2.3.1. スクリーニング系の選択

---

生産性向上物質のスクリーニングには、試験試料数例を稼ぐため細胞の準備など扱いが容易な96穴プレートなど容量の小さな系が望ましく一般的である。しかし、我々は以下の理由から三角フラスコ培養を採用した。①短い検討期間で実製造スケールでも確実に生産性を上昇させる因子の取得が必要であること、②少しでも改善効果のある因子を漏らしたくないこと。静置法である96穴プレートよりも酸素供給能力が高い動的な培養法である三角フラスコを培養容器に採用することによって十分な細胞生育が得られる。細胞が良好に増殖するとCCD (cells/mL×d)の増大を示し、CCD (cells/mL×d)とSPR (mab-pg/cell/d)の積から得られる抗体濃度 (mg/L)の差が顕在化することから、生産性のより微細な変化を検出することができる。また、良好な再現性により繰り返し実験数を低減することで試験例数を確保できる。効果の得られた物質に関しては、確認実験としてさらに安定な培養経過を示す1-Lバイオリアクターに供試・培養することで確実なスクリーニング手法とした。

### 2.3.2. スクリーニング供試薬剤の選定

---

医薬品の実製造を考慮すると、培地への添加物には安全性(Michiels et al., 2011)、コスト、安定性、安定供給、簡便な使用方法、精製工程への影響、特許状況、規制(Hesse, Wagner, 2000)など様々な制約が存在する。このような背景の元、文献や培地メーカーからの情報等をもとに(1)栄養的な側面、(2)抗酸化機能への着目、(3)電子伝達系の改善、(4)増殖抑制、細胞周期制御、(5)ストレス応答蛋白、(6)加水分解物などの群に分けて候補物質を机上選択し実験に用いた。

#### 2.3.2.1. 栄養的な側面

---

タウリン (0, 30, 50, 100, 500, 1,000, 5,000  $\mu$ mol/L), グリセロール (0%, 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 20% (v/v)), 脂質, Intralipid<sup>®</sup> ( $10^{-7}$ %,  $10^{-6}$ %,  $10^{-5}$ %,

10<sup>-4</sup>%, 10<sup>-3</sup>%, 10<sup>-2</sup>%, 10<sup>-1</sup>%) , Lipid mixture 1, Lipid mixture 2, Lipid medium supplement, Fatty acid supplement, リピッドミックス, Fatty acid solution, リゾフォスファチジン酸, コレステロール, リノレン酸, コウジ酸, サポニン, ゲニステイン, キトサン.

#### 2.3.2.2. 抗酸化機能への着目

---

グルタチオン (0, 50, 100, 500, 1,000  $\mu$ M) ,  $\alpha$ -トコフェロール (0, 2, 50, 500, 5,000  $\mu$ M), プロアントシアニジン-2 (0, 50, 100, 500, 1,000  $\mu$ M), 尿酸 (0, 50, 100, 500, 1,000  $\mu$ M) , アスコルビン酸 (0, 50, 100, 500, 1,000  $\mu$ M) , p-ヒドロキシ安息香酸 (CoQ<sub>10</sub>の precursor : 0, 100, 500, 1,000, 5,000  $\mu$ M) , メルカプトエタノール (0, 100, 500, 1,000, 5,000  $\mu$ M) , ポリヒドロキシ酪酸,

#### 2.3.2.3. 電子伝達系の改善

---

CoQ<sub>10</sub>, コハク酸, CoQ<sub>0</sub> : 2,3-Dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone (0, 50, 100, 500, 1,000, 5,000  $\mu$ M)

#### 2.3.2.4. 増殖抑制, 細胞周期制御

---

酪酸ナトリウム

#### 2.3.2.5. ストレス応答蛋白

---

温度制御 (ヒートショック 42°C処理 : 0, 1, 3, 5 hr, 0/N)

#### 2.3.2.6. 油

---

ダイズ由来, 魚由来, オリーブ

#### 2.3.2.7. ホルモン

---

デキサメタゾン, プロゲステロン

#### 2.3.2.8. 物理応力保護剤

---

グリセロール, Ficol 70, Ficol 400, デキストラン T40, PEG3000, ポリビニルプロピレン, メチルセルロース, カルボキシルメチルセルロース

#### 2.3.2.9. 複合

---

Ficol + 培養液量 + 細胞播種密度, CLC +  $\beta$ -CD

CLC: Cholesterol Lipid Concentrate (Lifetechnologies, CA, USA) の略称

#### 2.3.3. CoQ<sub>10</sub> 溶解法の検討

---

CoQ<sub>10</sub> は非常に強い脂溶性を持つことから, CoQ<sub>10</sub> 単独での効果を確認する目的で種々の溶解法を検討した.

##### 2.3.3.1. リポソーム

---

CoQ<sub>10</sub> 溶液のリポソーム化を試みた (Sunamoto, Iwamoto, 1988). 作製されたリポソームが大小様々なサイズであったことから, 0.2  $\mu$ m フィルターによる無菌ろ過を試みた. しかし, ろ過は困難であり, ろ過後の定量性が失われてしまうことから本検討には望ましい方法ではなかった.

##### 2.3.3.2. 加圧エマルジョン化

---

脂溶性の高い物質を加圧, 加熱条件下で溶解する方法が知られる. Emulsi Flex<sup>®</sup>C-5 (www.avestin.com) により, いくつかの脂溶性物質によるエマルジョンの作成を試みた. CoQ<sub>10</sub> に関しては機器の細孔を通過できず作成できなかった.

#### 2.3.4. CoQ<sub>10</sub> 単独効果の検証

---

前述で得られた CoQ<sub>10</sub> : Tween80 (1 : 2) + EtOH による溶解法調製液を用いた静置バッチ培養を実施した. 50  $\mu$ M 時に実測量として 25.8  $\mu$ L を添加した. その他は比例計算で加えた. 0, 50, 500, 1,000  $\mu$ M にて検討 (CoQ<sub>10</sub> 無添加は Tween80 の同量添加を実施). その結果, 生育にも若干の改善効果を示し, CCD は Tween80 添加区で 3.0 cells/mL $\times$ day, 50  $\mu$ M の CoQ<sub>10</sub> 添加区で 4.3 cells/mL $\times$ day と微増であった. 一方,

SPRの上昇は、それぞれ 8.8 mab-pg/cell/d, 11.1 mab-pg/cell/dであった。以上より、CoQ<sub>10</sub>には SPRの上昇効果があることを見出した。500, 1,000 μMでは増殖阻害が生じた。恐らく Tween80の阻害によるものと推察された。

さらに、増殖可能限度の 50 μMで前述の溶解検討によって取得された SPRの向上を確認するために 1-Lリアクター培養による検証を試みた。対照には CoQ<sub>10</sub>溶解の界面活性剤に用いた Tween80を添加した。Tween80溶液を添加した対照培養に対して、CoQ<sub>10</sub>/Tween80溶液を添加した培養は到達細胞密度が高く CCDが 3.0 cells/mL×dayに対して 4.3 cells/mL×dayに上がった。SPRは、Tween80を添加した対照培養が無添加 8.5 mab-pg/cell/dとほぼ同じ 8.8 mab-pg/cell/dであったのに対して、CoQ<sub>10</sub>/Tween80溶液を添加した培養は 11.1 mab-pg/cell/dを示し SPRは 1.26倍となり増大が再現された

(Fig. 1, B)。IgG1キメラ抗体濃度は Tween80を添加した対照培養 260 mg/Lに対して CoQ<sub>10</sub>/Tween80溶液を添加した培養は 478 mg/L (1.84倍)を示した。

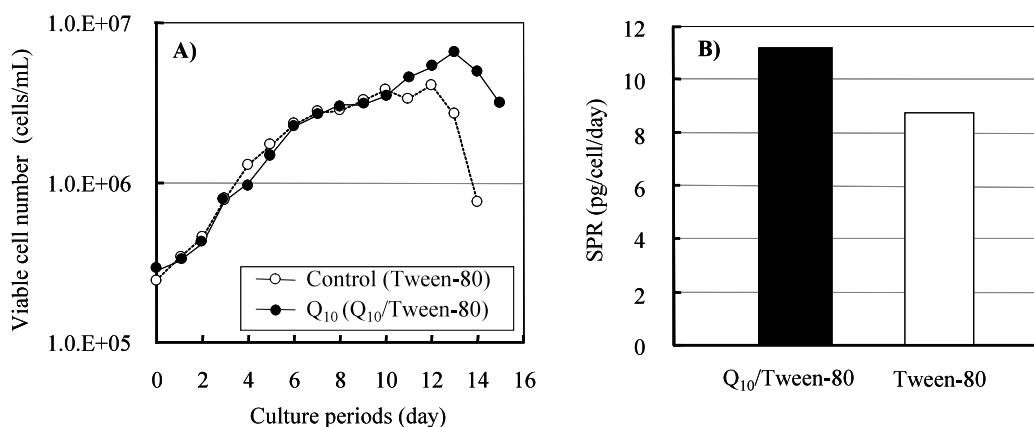


Figure 1. Effects of CoQ<sub>10</sub> on SPR. The YB2/0 cell line was cultured with Q<sub>10</sub>-Tween-80 (closed circle) and Tween-80 (control; open circle) in a 1-L reactor (ABLE, Tokyo, Japan). A) Comparison of cell growth, B) comparison of SPR. Similar results were obtained with cultures in 250-mL Erlenmyer flasks.

### 2.3.5. SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub>

CoQ<sub>10</sub>は有用な物質であるが、強い難水溶性により水系での使用が制限されている。健康食品においても種々の検討が試されており、CoQ<sub>10</sub>サプリメントとして SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub>

が見出されている。SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub>は、CoQ<sub>10</sub>に加えアルコール、グリセロール、レシチン、水を含む。SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub>の培養への応用には、アルコールの増殖阻害が考えられる。アルコールの感受性は細胞によって異なり、添加による増殖への影響が懸念された。一方で、溶解法に関する特許を保有し粒子径 50 nm 以下に液 - 液拡散された SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub>を用いれば従来の報告に示されない高濃度での培地添加が可能となることが期待された。

#### 2.3.5.1. 初期検討培養

---

初期検討として SF 培地への SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub> の添加培養を T-225 フラスコで試みた。SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub> 50 μL 中の CoQ<sub>10</sub> 含量は 2.5 mg であるから 50 μg/μL と計算される。CoQ<sub>10</sub> の分子量 863 より SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub> 中の CoQ<sub>10</sub> は 58 mmol/L と換算される。SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub> は CoQ<sub>10</sub> の特徴的な色である鮮やかなオレンジ色をした液体である。0.2 μm の無菌フィルター（ザルトラボミニ）で無菌ろ過処理し必要量を 30 mL の培地に懸濁し T-225 フラスコでの培養に供試した。CoQ<sub>10</sub> 濃度は 10, 30, 100, 500 μmol/L で実施した。培養 0 から 1 日目にかけては CoQ<sub>10</sub> の添加に起因すると考えられる増殖阻害が示された。阻害が生じた試験区は培養期間を延長した。その結果、CCD はいずれも  $2 \times 10^7$  cells/mL×day で大きく変わらなかった。IgG1 キメラ抗体濃度は CoQ<sub>10</sub> 濃度が高いほうから 220, 186, 181, 138, 155 mg/L を示し、一部、逆転はあるものの添加濃度依存的に高い IgG1 キメラ抗体濃度を示した。その結果、SPR は対照培養の 8.5 mab-pg/cell/d に対して 14.5 mab-pg/cell/d まで増大した。すでに構築されたセルバンクのため、SPR の改善は困難だと考えられていたが、1.4 倍に改善し、従来法の 140% の抗体力価を得た。

#### 2.3.5.2. リアクター培養

---

CoQ<sub>10</sub> 単剤での生産性増強効果が示されたことから SANOMIT<sup>®</sup> CoQ<sub>10</sub> による 1-L リアクター培養を実施した。CCD は添加の有無に関わらず大きく変わらなかった。SPR は対照 6.9 mab-pg/cell/d に対して SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub> 添加試験では 8.9 mab-pg/cell/d に増大した。その結果、IgG1 キメラ抗体濃度は 330 mg/L から 430 mg/L まで増大した。

#### 2.3.5.3. CoQ<sub>10</sub> 関連物質の添加検討

---

SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub> で示された作用が、脂溶性が低い CoQ<sub>0</sub> で示されれば取扱いが容易で実用的であることから添加培養を試みた。しかし、いずれの添加濃度（0, 50, 100, 500, 1,000, 5,000 μM）でも増殖阻害が示され培養 2 日目には死滅した。CoQ<sub>10</sub> の precursor



となる p-ヒドロキシ安息香酸 (0, 100, 500, 1,000, 5,000  $\mu\text{M}$ ) でも効果は示されなかった (データ非表示) .

#### 2.3.5.4. 抗酸化剤

---

抗酸化剤として知られる CoQ<sub>10</sub> で効果が示されたことから, 種々の抗酸化剤に関しても検討した. 抗酸化剤は多様で, 溶解性に応じてスカベンジャーとしての作用も多様である. 大まかには, アスコルビン酸など水溶性の抗酸化剤は細胞間の水溶性部位で機能し, トコフェロールなど脂溶性の抗酸化剤は細胞内の脂溶性部位で機能し, 両溶性のポリフェノール類は細胞の膜上, 細胞の内外で機能を示す. 抗酸化剤の一つであるプロアントシアニジン B2 は分子量 578 で, トコフェロールよりも強い抗酸化作用を持つとされる水溶性物質である. 毛髪上皮細胞への最大活性は 30  $\mu\text{M}$  であり生産性向上が期待された. しかし, グルタチオン (0-1,000 mM),  $\alpha$ -トコフェロール (0-5,000 mM), プロアントシアニジン B2 (0-1,000 mM), 尿素 (0-1,000 mM), アスコルビン酸 (0-1,000 mM), 2-メルカプトメタノール (0-5,000 mM), ヒドロキシ酪酸といった抗酸化剤では培地への添加による著しい生産性向上の効果は示されなかった. いずれの抗酸化剤でも同様の結果であり, CoQ<sub>10</sub> による SPR の上昇はその抗酸化作用に起因しないことが示唆された.

---

#### 2.3.6. 活性酸素傷害指標となる 8-ヒドロキシデオキシグアノシン

---

活性酸素は呼吸の際に発生することが広く知られており, 活性酸素は DNA 上に傷害を発生し様々な変異を蓄積するといわれている (大柳善彦, 2001). 活性酸素の 90%以上はミトコンドリアで発生するため核 DNA よりもミトコンドリア DNA で損傷が大きいことが知られている (Richter et al., 1988). 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) は, 細胞内で活性酸素傷害が引き起こされたミトコンドリア DNA や核 DNA の傷害損傷すなわちデオキシグアノシンの酸化が起こると生成し, 血中や尿中で安定である. したがって, 傷害度合いは 8-OHdG を測定することで測定できると言われており, DNA 損傷マーカーや酸素障害や老化のマーカーとして注目されている. 一方で, 細胞培養プロセスを死にいたらしめる原因が何かは, かねてより議論されてきた点であり, 筆者が所属する会社でもフェドバッチ培養後期に DNA ラダーが確認されている (データ非表示). 一般的に, 培養終期の死滅の主因はアポトーシスであることが知られており, アポトーシス誘導要因の一つとされる活性酸素傷害を培養終期の死滅原因の一つとして推測できる. 動物細

胞による生産性向上物質としてはセリシンの報告が知られているが、セリシンには大腸粘膜の細胞増殖抑制によると考えられる大腸癌の発現抑制が見出されており、8-OHdGの減少が報告されている (Sigin Zhaorigetu et al., 2001). 活性酸素傷害の指標となる8-OHdGの挙動は細胞培養の観点でも興味深い、リアクター培養の経時測定報告は無い。

### 2.3.7. CoQ<sub>10</sub> 添加時における 8-ヒドキシデオキシグアノシン濃度測定

抗酸化剤である CoQ<sub>10</sub> 添加時に比抗体生産速度の増大が確認されたことから、抗酸化剤の添加の有無による DNA の酸化損傷の違いを先述の 8-OHdG 測定系による培養上清の測定によって検討した。Fig.2 A), B), C) は増殖曲線、8-OHdG の経時変化、および IgG1 抗体と CCD の相関を示したものである。その結果、驚いたことに、SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub> 添加の有無に関係なく酸素障害が培養経時的に蓄積していることが明らかとなった。

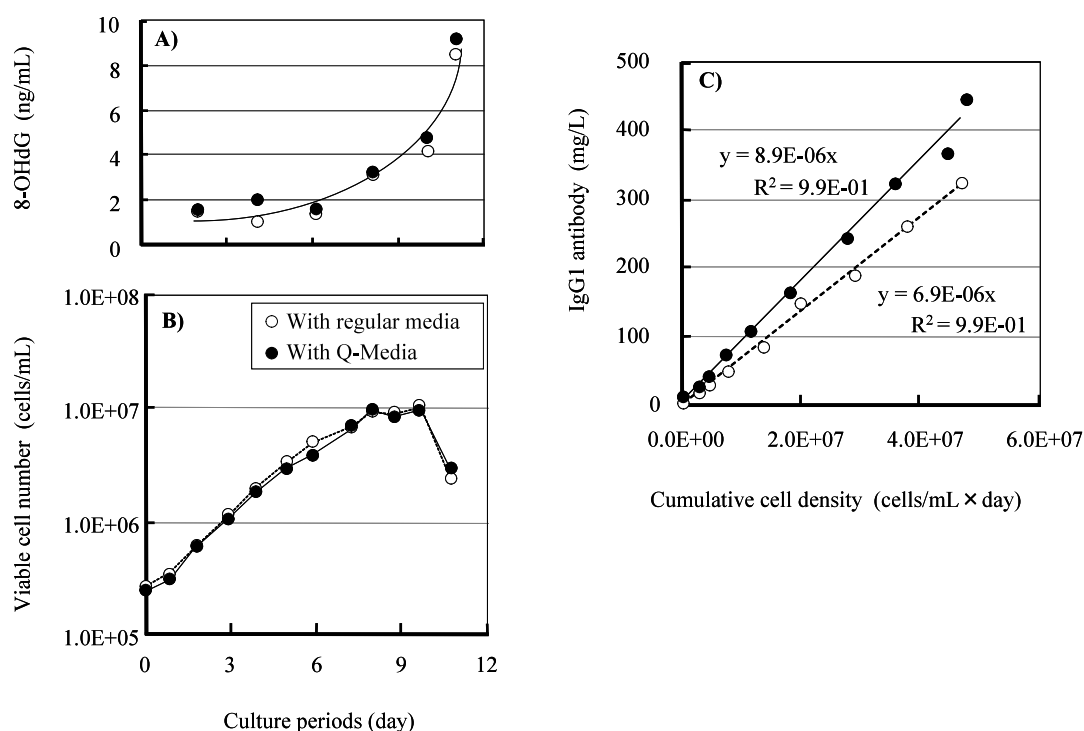


Figure 2. Effects of Q-Media (500 μM CoQ<sub>10</sub> using dispersion of nano-particles in Hybridoma-SFM) on SPR. The YB2/0 cell line was cultured with (closed circle) or without (open circle) Q-Media in a 1-L bioreactor (ABLE, Tokyo, Japan), which expressed recombinant mouse/human chimeric IgG1 antibody. A) Time course of 8-OHdG concentration,

B) comparison of cell growth, and C) amount of MAb vs. cumulative cell density (slope corresponds to SPR).

8-OHdG は活性酸素傷害のマーカーとして老化研究などに用いられている (Richter et al., 1988). 8-OHdG の動物細胞による物質生産系での経時変化の測定例は, 本例が恐らく初めてとなる. Fed-batch 培養は閉鎖系であることから培養が経過するにしたがって, アンモニア, 乳酸, CO<sub>2</sub> などに代表される老廃物, 副産物の蓄積やそれにもなう浸透圧の上昇, 必要栄養素の不足などにより, 培養はアポトーシスによって終了するとされる. 先述の通り, 筆者が所属する会社でも Fed-batch 培養終期に DNA の断片化を確認している. 8-OHdG の培養上清中の濃度を測定した結果, 経時的に上昇することを見出し, Fed-batch 培養中の DNA の酸化損傷の蓄積を明らかにした. CoQ<sub>10</sub> を添加し生産性向上が認められた培養上清の 8-OHdG 濃度の測定を試みたが, ほとんど同様の傾向を示した. CoQ<sub>10</sub> の SPR 上昇効果が主に細胞への酸化作用に対する抗酸化作用に有るのであれば何らかの挙動変化があることを期待したが, 予測とは異なる結果となった. 期待とは異なった結果であり, 抗酸化作用以外の効果によって CoQ<sub>10</sub> の効果が示されている可能性を示唆した.

5-L Jar での検討において培養開始直後から細胞当たりの ATP 含量が低下することが見出されている (データ非表示). CoQ<sub>10</sub> は電子伝達系の主要物質であり, 培養細胞によっては報告されている ATP 産生効果が, YB2/0 を用いた生産培養においても同様に作用することによって生産性が增强されているのであれば興味深い. 一方で, ATP 産生が增强されているのであれば, なぜ, 細胞増殖改善が見られないのか興味深く, 今後の検討を要するところである.

---

### 2.3.8. 中央代謝への影響

---

CoQ<sub>10</sub> の添加により代謝的にはグルコース消費速度と乳酸生産速度の比 (L/G 比) の低下が認められることから, TCA 回路の効率的な回転が推察される. ピルビン酸から乳酸への代謝, あるいは TCA サイクルの流入については増殖期と非増殖期での代謝シフトが報告されているが (Sengupta et al., 2011), 本結果では生育に差が無いことからエネルギー効率の変化の有無は大変興味深い. また, 光学顕微鏡による観察では CoQ<sub>10</sub> の添加により細胞のつや, 明るい視野が示され健全な生育環境を示唆した (データ非表示).

低酸素症ウサギへの CoQ<sub>10</sub> 投与検討では、低酸素症によって嫌氣的に解糖系が亢進し乳酸が蓄積された系へ CoQ<sub>10</sub> を投与することによって乳酸代謝改善を見出ししており (Eguchi, 1984), 同様の作用が培養系への SANOMIT® Q<sub>10</sub> の添加によって導かれ、乳酸蓄積が軽減し ATP 代謝が活性化されたことが推察される. さらに、生理的には CoQ<sub>10</sub> 投与による血中 ATP 含量の増大が報告されており (Kajiwara, 1984), CoQ<sub>10</sub> は電子伝達鎖の重要物質であることから ATP の生産改善が推察されるところである. 加えて、心筋で CoQ<sub>10</sub> の濃度が低下した時にエネルギー生産性が低下し ATP 濃度が低下した際には、CoQ<sub>10</sub> の投与によってエネルギー生産が改善されることが知られている (Kishi et al., 1993). 一方で、基本エネルギーの ATP が増大していると仮定した場合に、CoQ<sub>10</sub> の添加の有無にかかわらず、CCD の著しい増加はみられておらず、その効果が生産性のみに関与している点などは興味深い点である. 同様に前駆体である CoQ<sub>0</sub>, コハク酸の添加検討を試みたが、培養 2 日目には増殖阻害が示され SPR の向上効果は認められなかった.

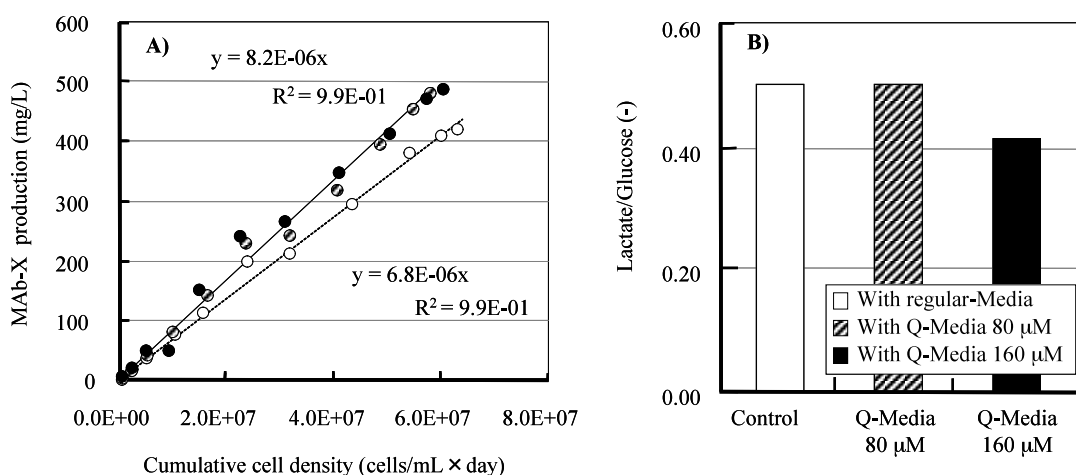


Figure 3. Effects of Q-Media (80 or 160 μM CoQ<sub>10</sub> using dispersion of nano-particles in CD Hybridoma) on SPR. The YB2/0 cell line was cultured in a 1 L bioreactor with 0 (open symbol), 80 (hatched symbol), or 160 μM CoQ<sub>10</sub> (closed symbol), which expressed recombinant mouse/human chimeric IgG1 antibody. A) Amount of MAb vs. cumulative cell density and B)  $Q_{\text{Lactate}} / Q_{\text{Glucose}}$  ratio.

---

### 2.3.9. CoQ<sub>10</sub> 添加によるカルシウムの動員

---

細胞内 Ca<sup>2+</sup> は、さまざまな細胞におけるセカンドメッセンジャーとして重要な役割を演じている。安静時には、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) は、100 nM (10<sup>-7</sup> M) 前後の低濃度に保たれていて、細胞外から何らかの刺激をうけることにより、さまざまな Ca<sup>2+</sup> 透過性チャンネルを通して、濃度勾配によって 10<sup>-3</sup> M の高濃度にある細胞外からの Ca<sup>2+</sup> の流入がおこり、一過性の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の上昇が引き起こされる。その結果、細胞内情報伝達機構を通してさまざまな細胞機能を制御している (Harada, 2008)。

ATP (10 μM) の添加および CoQ<sub>10</sub> の添加で細胞内カルシウム濃度が上昇した (Figure 4)。一方で、生産性向上物質として知られる GMP および DMSO では濃度上昇は認められず、10% DMSO でわずかに上昇が認められたに過ぎなかった (データ非表示)。したがって、これらの生産性向上物質と CoQ<sub>10</sub> とは作用メカニズムが異なることが示唆される。

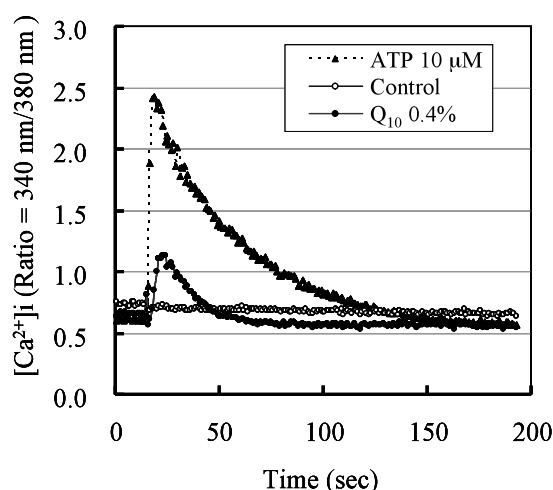


Figure 4. Effects of CoQ<sub>10</sub> on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> of CHO cells. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was analyzed using the fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator fura-2. Effects of CoQ<sub>10</sub> (232 μM, closed circle) and ATP (positive control, 10 μM, closed triangle). Negative control data (buffer) are also shown (open circle).

---

### 2.3.10. CoQ<sub>10</sub> 添加培養による生産物の ADCC 活性

---

医薬品の製造工程変更においては、変更前後の生産物の同等性を証明する必要がある。生産性が増大しても生産物の活性に影響があれば、新たな臨床試験を要求される。生物学的な活性としては細胞傷害性 (ADCC) 活性が重要とされている。ADCC 活性は抗体糖

鎖中のフコースの含量（deFuc%）に影響されることが報告されており (Shinkawa et al., 2003). 培養工程としては生産抗体の deFuc%を一定幅に収めることが要求される. ここでは, 5-L Jar における SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub> 添加培養で得た IgG1 キメラ抗体によって ADCC 活性の測定を対照培養と比較した. Fig. 5 A), B) は得られた抗体の結合活性と ADCC 活性の測定結果を示したものである.

対照培養と SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub> 添加培養とは結合活性, ADCC 活性ともに差は認められなかった. Q<sub>10</sub> 添加の有無は生産抗体 IgG1 キメラ抗体の ADCC 活性に影響しなかったことから, 医薬品の生産性向上物質として好適である.

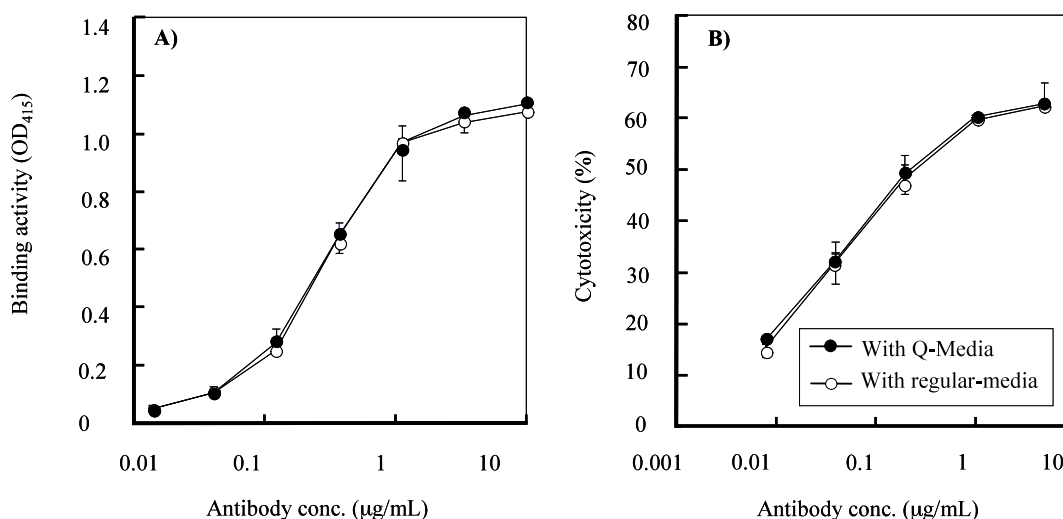


Figure 5. Comparison of MAbs produced in Q-Media and regular media. MAbs expressed by YB2/0 cells cultured in Q-Media and regular media were separately purified and their activities to bind to their antigen (panel A) and kill their target cells (ADCC, panel B) were analyzed by ELISA and <sup>51</sup>Cr-release assays, respectively.

### 2. 3. 11. 他細胞 (NS0, CHO 細胞) への効果

SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub> の添加による SPR 向上効果を他宿主でも検討した. 他宿主としては, キメラ抗体 IgG 抗体 B を生産する形質転換 CHO 細胞株, キメラ抗体 IgG 抗体 B を生産する形質転換細胞株 NS0 株を用いた. CHO 細胞の系ではフィード中に SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub> を添加し,

培養3日目からフィードを添加することによって槽内濃度 121 から 393  $\mu$ M まで段階的に上昇させた。NS0 細胞の系では培養初日から SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub> 濃度 100  $\mu$ M となるように添加した。その結果、CCD がやや減少し、SPR は対照培養に対して 30%増大した。

## 2.4. 小括

---

以上、本研究では YB2/0 細胞で発現される抗体の生産性を増強する物質・手法の探索を試みた。

生産性向上物質の探索を実施した。実用に向けた探索であることを考慮し、三角フラスコでの系を選定した。Tween80 を補助剤に溶解した CoQ<sub>10</sub>、および CoQ<sub>10</sub> を含有する健康食品 SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub> の添加により SPR の増大を確認した。CoQ<sub>10</sub> の単独溶解による初期検討を実施した。8-OHdG 測定により、培養経時的に酸化ストレスが蓄積していることを見出した。SANOMIT<sup>®</sup> Q<sub>10</sub> の添加では DNA の酸化損傷マーカーである 8-OHdG 濃度は抑制されず、酸化ストレスは軽減していないと推察された。CoQ<sub>10</sub> により生産性を増強しても、生産物の品質に影響しないことを本研究で示した。

なお、YB2/0 のフェドバッチ培養 (W0/01/29246)、CoQ<sub>10</sub> の生産性増強作用 (W0/03/046174)。それ以外の物質を生産性増強因子としてまとめ (W0/2007/049567)、それぞれを特許として出願した。

## 第 3 章 糖鎖制御

---

### 3.1. 緒言

---

広く普及した抗体医薬では、特に IgG 型の抗体が多く用いられている。IgG 型抗体は、ジスルフィド架橋で結合した 2 本の重鎖と 2 本の軽鎖からなるヘテロ 4 量体である。IgG1 抗体は 2 本の N 型結合バイアンテナリー (biantennary) 糖鎖を Fc 領域にある Asn 297 に結合している。Fc 領域のグリコシル化が IgG の生物学的活性、特に補体に媒介される細胞溶解 (CDC)、および抗体依存性の細胞傷害 (ADCC) にとって必須である。近年の抗体医薬品開発の成功により、抗腫瘍効果の増強は次世代の抗体医薬として開発が急がれている。コンジュゲートなどに代表される高い活性を持った抗体の開発とともに、高い細胞傷害性 (ADCC) 活性抗体技術もその一つと位置付けることができる。

ADCC 活性は、既に上市されている抗体の中で薬理効果がわかっているいくつかの抗体の主要活性であり、製造においては ADCC 活性の安定した原薬を供給する必要がある。現在までに米国で上市された治療用抗体は動物細胞培養によって製造されたものであるが、上市抗体の一つとして知られる CAMPATH-1H<sup>®</sup> は当初 Y0 細胞を宿主として開発が着手され、生産性を理由に生産工程では CHO 細胞に工程変更されていると推察される。グローバルで承認された抗体医薬品 29 品目のうち約半数となる 14 品目が CHO 細胞を宿主としているとされており (Beck et al., 2008)、宿主細胞由来の蛋白の分析キットなどに代表されるツールや種々の情報が充実している。ますますこの傾向は高まるものと考えられる。したがって、高い ADCC 活性抗体を作成する技術が CHO 細胞を宿主として安定して得られれば、産業への寄与は大きい。筆者が勤務する会社でも高い ADCC 活性抗体を生産する CHO 細胞が、抗体糖鎖へのフコース付加に関与する酵素 FUT8 の遺伝子ノックアウト CHO 細胞株として取得されている (Yamane-Ohnuki et al., 2004)。

開発着手からこのような宿主細胞を用いることが安定した構築の観点、品質を将来に渡って管理していく観点からも望ましい。しかし、開発の長期化傾向にかげりは無く、開発スピードを落とすことなく開発を進めるための判断として、バンク変更のリスクを許容しないケースも十分に想定できる。ひとたび構築された Working Cell Bank (WCB) を用いて、ADCC 活性の因子である抗体糖鎖中のフコース含量の制御方法の創出が期待さ



れるが、これまでに抗体糖鎖中のフコース不含率% (以下 deFuc%) を制御する具体的な制御手法は確立されていない。

YB2/0 細胞で生産される抗体の ADCC 活性が高いことは知られているが (Kanda et al., 2006), YB2/0 細胞を宿主とした医療用抗体が上市された例は未だ無く、品質管理の観点での議論、研究に関する情報は皆無である。

一方で、動物細胞培養で生産される蛋白質に結合した糖鎖に関しては、アンモニアのシアル酸付加量への影響など培養環境の糖鎖への影響が知られている (Chen, Harcum, 2006; Yang, Butler, 2000)。積極的に糖鎖中の単糖組成を制御した培養例としては、以下の公開特許があげられる。Genentech 社により出願された温度、培地中の銅含量、酪酸ナトリウムによるシアル酸含量の制御を目的とした公開特許や (Ry11, 2003)、大阪大学、三菱ウェルファイドにより出願された糖消費速度を指標にしてそれを変化させることにより糖鎖構造を変化させる公開特許 (Takeshi Omasa et al., 2003)、雪印乳業によって出願された培地中の糖組成あるいは糖濃度を変更することによって生産される糖鎖の種類あるいは分子量を改変することを目的とした公開特許 (Hirofumi Tachibana et al., 1994)、中埜酢店より出願されている培地中にグルコサミンまたは *N*-グルコサミンを添加することによりガラクトース残基を持たない糖鎖を高い比率で得ることを目的とする公開特許などである (Kazuo Shimada et al., 1999)。いずれも、温度と銅イオン濃度と複数の制御項目を上げていたり、Fed-batch 中に絶えず変化し実質制御困難な糖消費速度を制御項目に上げていたり、抗体糖鎖中の糖組成を工業レベルで一定に制御する技術としては課題が残される。

本章では YB2/0 細胞で生産される抗体糖鎖の deFuc% が培養中の浸透圧に依存することを見出し、工業的な技術利用の観点から抗体糖鎖中の Fuc 含量を制御する培養手法を検討した。また、分子生物学的な初期知見についても議論する。浸透圧は細胞培養の重要パラメータの一つであり、これまでも種々の検討がなされているにもかかわらず (Table 2.)、deFuc% の制御例は見出せない。

Table 2. Reported effects of medium osmolality in animal cell culture

	Range (mOsm/kg)	Product	Cell line	reference
Productivity enhancer of mouse hybridoma	350 or 400	antibody (Ab)	hybridoma	(Oh et al., 1993)
	285–455	IgG2b anti-idiotypic anti Ab	hybridoma (S3H5/γ2bA2)	(Park, Lee, 1995)
Productivity enhancer of CHO	310	tissue plasminogen activator (tPA)	rCHO (MT2-1-8)	(Kimura, Miller, 1997)
	300, 250, 200, or 150	chimeric Ab	rCHO (CS13*-1.0)	(Lee, Lee, 2001)
	392, 469, 542, or 620	chimeric Ab	rCHO with different cloned gene dosage	(Ryu et al., 2001)
	300–500	tPA	rCHO [1-15500 (ATCC CRL-9606)]	(Takagi et al., 2001)
	294–522	humanized Ab against the S surface antigen of hepatitis B virus	rCHO (SH2-0.32)	(Kim et al., 2002)
	490	anti-Rhesus D IgG	rCHO DG44	(Zhang et al., 2010)
Improvement of Culture Longevity	223–540	IgG2b anti-idiotypic anti Ab	hybridoma (S3H5/g2bA2, DB9G8)	(Ryu, Lee, 1999)
Hypo-/Hyper-osmotic stress	168–329	IgG2b anti-idiotypic Ab	hybridoma (S3H5/g2bA2, DB9G8)	(Soo Ryu, Min Lee, 1997)
	285–425	chimeric Ab	transfectoma (KR12H-2)	(Lee, Lee, 2000)
Increased cell size	290, 338, 386, 435, or 580	IgG1	mouse hybridoma (167.465.3)	(Ozturk, Palsson, 1991)
	300–520	IgG1	mouse hybridoma (6H11)	(Øyaas et al., 1994)
Intracellular level in osmolyte	273 or 600	-	mouse L-929 cells	(Libioulle et al., 2001)
-omics analysis	300 or 450	chimeric antibody directed against hepatitis B virus	rCHO DG44 (CS13*-1.00)	(Lee et al., 2003)
	100 above vs. control	IgG2a directed against CD3	mouse hybridoma OKT3	(Shen, Sharfstein, 2006)
	350–650	anti-Rhesus D IgG	rCHO (B0)	(Shen et al., 2010)
	206 or 498	-	ES cell (CGR8)	(Mao et al., 2008)
	290 or 450	Chimeric B72.3 IgG4	rGS-NS0	(Wu et al., 2004)

Metabolism	280–370	MAB	rNS0	(Zhao et al., 2009)
Apoptosis	315–610 with 90 mM-NaCl	EPO, MAb	rCHO	(Han et al., 2010)
Aggregation	300, 340, 367, or 395	Anti PSA MAb	hybridoma	(Franco et al., 1999)
	360, 390, 430, 470, or 510	IFN- $\beta$	rCHO	(Han et al., 2009)
Cell cycle	From 290 up to 400	IgG1 directed against phosphorylcholine	hybridoma	(McNeeley et al., 2005)
	From 290 up to 400	IgG1 directed against phosphorylcholine	hybridoma	(Sun et al., 2004)
Osmolyte	335–500	Moloney mouse leukaemia virus derived retroviral vectors	Fly A7, HCT-116 (ATCC CCL-247)	(Coroadinha et al., 2006b)
Osmoprotective compounds (Osmoprotectant)	300–520	Ab	mouse hybridoma (6H11)	(Øyaas et al., 1994)
	292, 467, or 561	hTPO	rCHO (dhfr-B22-4, CS13-0.02*, and CS13-1.00*)	(Ryu et al., 2000)
	305, 458, or 537			
	335, 350, 400, 480, or 570	tPA	rCHO (MT2-1-8)	(Schmelzer, Miller, 2002a)
Glycosylation and pCO <sub>2</sub>	310–376	tPA	rCHO (MT2-1-8)	(Kimura, Miller, 1996), (Kimura, Miller, 1997)
	337–469	IgG2a MAb against benzene-arsenate	hybridoma	(deZengotita et al., 1998)
	105, 76.8, or 52.6 mM NaCl controlled at 320 $\pm$ 5	tPA	rCHO (MT2-1-8)	(Zanghi et al., 1999)
	320, 375, 435, or 476	IgG2a MAb	hybridoma AB2-143.2	(deZengotita et al., 2002)
	320, 375, 435, or 475	IgG2a MAb	hybridoma AB2-143.2,	(Schmelzer, Miller, 2002b)
	303,313,347, or 336	recombinant fusion glycoprotein B1	rCHO DG44	(Borys et al., 2010)
Optimized cell growth	40–250 mM-NaCl	–	HeLa	(Elton Stubblefield, Mueller, 1960)

## 3.2. 試料

---

### 3.2.1. 使用細胞株

---

宿主細胞には, ラットハイブリドーマ YB2/0 (ATCC CRL-1662, VA, USA) を用いた (Shitara et al., 1994). マウスヒトキメラ型 IgG1 抗体 A および B をそれぞれ発現する YB2/0 細胞を Hybridoma-SFM, CD-Hybridoma 培地 (Lifetechnologies, CA, USA) に必要に応じて添加剤を添加し 250 mL 容量の三角フラスコ (Corning, NY, USA), またはバイオリアクターで培養した. また, SP2/0 細胞 (ATCC, CRL-1581) と NS0 細胞 (Riken, RCB0213, Japan) を用いた. SP2/0 と NS0 細胞はマウスヒトキメラ型 IgG1 抗体 A を発現した.

### 3.2.2. 使用原料

---

CD-Hybridoma AGT 培地は粉末顆粒体を用いた. また, 使用に際しては High Density Lipid Concentrate (HDLC, Invitrogen 社) を 0.4% (v/v) 添加した.

## 3.3. 方法

---

### 3.3.1. 培養装置

---

三角フラスコ培養には, 回転振とう機 (タイテック) を用いた. バイオリアクターは, フラットパドルの 1-L (ABLE, Tokyo, Jaoan), ディスクタービンの 30-L (Bioengineering AG, Wald, Switzerland), ピッチドブレードの 5, 400-L (丸菱バイオエンジ, Tokyo, Japan) 槽を用いた. 1-L 槽は非加圧槽である. 接着性の細胞は cell culture bag (Medtronic, MN, USA) または T-225 cm<sup>2</sup> フラスコ (IWAKI, Tokyo, Japan) を用いた.

### 3.3.2. 分析方法

---

細胞密度および生存率は CEDEX カウンター (Inovatis AG, Bielefeld, Germany) を用いて 0.4% トリパンブルーを用いた色素排除法にて計測した. オフラインのグルコース, 乳

酸濃度の測定は、固定化酵素電極法 YSI2700 SELECT (Yellow Springs Inc., OH, USA) で測定した。培養上清中の IgG1 キメラ抗体濃度は、ProteinA カラムを用いて HPLC で測定した。培地中の浸透圧は、凝固点降下法による Vogel Osmometer0M802-D (Vogel, Giessen, Germany) で測定した。抗体糖鎖のフコシル化は新川らの方法に従って、それぞれの精製抗体から単糖組成分析した(Shinkawa et al., 2003)。トータル RNA の取得方法は新川らの方法に従った。FUT8, GMD の RT-PCR 測定は神田らの方法に従った(Kanda et al., 2006)。GDP-フコースの代謝発現解析の RT-PCR は吉末らの方法に従った(Yoshisue et al., 2002)。使用した特異的なプライマーを Table 3 に示した。アレイに供した培養サンプルは培養 6, 9, 11, 12 日目に採取し Trizol<sup>®</sup>に懸濁し、冷凍保存し供試した。

Table 3. Oligonucleotide primers for RT-PCR analysis

Gene symble	Gene name	Forward primer(5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
ACTB <sup>*1</sup>	actin, beta	ACAGCTGAGAAGGGAAATCGTG	TCCACACAGAGTACTTGCGCTC
HMBS <sup>*1</sup>	hydroxymethylbilane synthase	TGGAGTCTAGATGGCTCAGATAGC	CCACAAACTACTGAGGGAAAGG
Gck	glucokinase	CAGAAAATGGCGGAAAATACTC	GAGATGATTCTGCTTGAATAGTG
Hk1	hexokinase 1	TCTAAACTCTGGGAAACAAAGG	AAGTTTGTAGAGCGTCCCATC
Hk2	hexokinase 2	GGACTCTGTATAAGCTTCATCCTC	GTACAGGAAGTAGAGTGGGGG
Hk3	hexokinase 3	AAGTTAAAGTATCTGGCCTTCTCC	GCAGATTTTCTTCTCCACATTC
Fpgt	fucose-1-phosphate guanylyltransferase	TCAAGAGCTAGGCTTACAGTCC	GCTCAGGTTCTCTTACTTCC
Fuca	fucosidase, alpha-L- 1, tissue	AGTCTGGGAGGCAACTATCTTC	TGTCAGCTTTAGAGTCCAGGC
Fuk	similar to L-fucose kinase	CTCTGGTCTTGGCACTAGC	GCTTCAGCACACTTCTCAGTC
Mpi	mannose phosphate isomerase	AATTCATTGATGTGTCAACCC	AGATTGCACAATAGGGACAGG
GMD	similar to GDP-mannose 4,6-dehydratase	TTTGTCATAGCTACTGGGGAAG	TAGATGCAGGGACAACACAG
Pmm1	phosphomannomutase 1	AATGACTTTGAGATCTATGCGG	CTCCAGAGTATAAGTCCCATGC
Pmm2	phosphomannomutase 2	GGAGTGGTAGGTGGGTCAG	CCTATGGAGAACGTGAGGC
Fut1	fucosyltransferase 1	CCCCAGAGAAACTTCAAAGAC	TATACCTGATGTAGCCAAATG
Fut8	fucosyltransferase 8	TTTAGACCTGTAAGTGAGACATGC	GTGCGAGAAGCTGAAAATG

\*1: The  $\beta$ -actin and hydroxymethylbilane synthase as reference genes were selected for calculating normalization factor with geNorm normalization (Vandesompele et al., 2002) from ten-genes.

---

### 3.3.3. 培養方法

---

播種密度は  $2 \times 10^5$  cells /mL 以上となるように播種し、37°Cで培養し、必要に応じて IMDM 培地中のアミノ酸ビタミン粉末を Feed した。バイオリアクターでの培養では、上面通気中の CO<sub>2</sub>，または 1 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を用いて pH 7.1 に制御した。溶存酸素濃度が 50% になるように酸素のスパージングによって制御した。パーフュージョン培養には Sorvall Centritech™ Lab II (Thermo, MA, USA) を用い任意の浸透圧培地に、約 4 日毎に段階的に制御した。灌流率は 1 vvd とした。これに対して接着性の細胞であった SP2/0 細胞と NS0 細胞は cell culture bag (Medtronic, MN, USA) または T-225 cm<sup>2</sup> の T フラスコ (IWAKI, Tokyo, Japan) を用いた。

---

### 3.3.4. 各計算式

---

生存率：生細胞数/総細胞数×100%

CCD：cumulative cell density：累積細胞密度 (cells×d/mL)

SPR：Specific Monoclonal antibody Production Rate，比抗体生産速度，

SPR = 抗体濃度 / CCD (mab-pg/cell×d)

予測 IgG1 キメラ抗体濃度：比抗体生産速度が一定 (8 mab-pg/cell×d) であることを仮定し累積生細胞数 (cells/mL) を乗じて抗体濃度を推算した。

---

### 3.3.5. 糖鎖制御フェドバッチ培養

---

浸透圧 350 mOsm/kg 前後に成行き調製された初発培地を加水により 240 mOsm/kg に希釈した。さらに、グルコースを 15 g/L 添加し最終調整浸透圧を  $330 \pm 10$ ，320 ~ 340 mOsm/kg とした。浸透圧調整には浸透圧調整剤としてグルコース 50% 溶液を用いた。ここでは一例を示したが、NaCl とグルコース溶液の比により任意に浸透圧と初発のグルコース濃度設定が可能である。培地調製時にグルコースを 15 g/L 添加した時 240 から 340 mOsm/kg に浸透圧が上昇することから培養の途中で浸透圧を 1 mOsm/kg 上昇させるためには、0.15

g/L のグルコースを添加すればよいと計算される。培養の初期である培養 2 日目から、あるいは対数増殖が終了した（する）培養 6 日目、8 日目から、浸透圧の調整を開始した。浸透圧の目標値は、浸透圧と deFuc%の過去のデータプロットから得られた経験的な直線である  $Y = -0.295X + 152.4$  を用い、Y に目標とする deFuc%50%, 70%, そして 80 % を代入して得られた 245, 347, 414 mOsm/kg を目標浸透圧とした。グルコース添加日には培養の進行に合わせて培養終了日 11 日目までの予測曲線を描き、グルコース添加日までに得られている浸透圧の実測値とともに、後述する CCD 分率による補正計算に用いた。添加日以降は、添加当日の調整予定浸透圧を入力した（実際にはグルコースが消費され浸透圧が変動するので誤差が生じる）。CCD 補正浸透圧を用いて目標値となりうる浸透圧をエクセルシート上で計算し添加 Glc 濃度を決定する。例として（設定値 390 mOsm/kg - 現在値 285 mOsm/kg） $\times 0.15 \text{ g/L/mOsm/kg} = 15.75 \text{ g/L}$  となり、終濃度 15.75 g/L のグルコース添加が必要となる。グルコース 50%溶液を添加するときは、局所的な浸透圧変化による細胞損傷を避けて、ペリスタティックポンプを用いて緩やかに添加した。

### 3. 4. 結果と考察

---

#### 3. 4. 1. 初発培地の浸透圧による抗体糖鎖フコース非含量（deFuc%）への影響

---

YB2/0 細胞培養の初発培地の加水希釈に応じて、糖鎖中 deFuc%は増大した（Fig. 6）。その傾向は培養 4 ~ 11 日目を通じて変わらなかった（データ非表示）。5-L バイオリアクターによる Fed-batch 培養のために、初発浸透圧を蒸留水で加水希釈し 285, 300, 325, 345 mOsm/kg に調整した。培養 11 日目には deFuc%は浸透圧が低い順に約 70%, 58%, 46%, 40%と逆相関を示した。既に YB2/0 細胞で発現された抗体の ADCC 活性が高いことは知られており (Kanda et al., 2006), 糖鎖中の deFuc%が高いことも既知だが (Shinkawa et al., 2003), YB2/0 細胞株が発現する抗体糖鎖中の deFuc%は必ずしも一樣に高いわけではなく培養条件により変動することを明らかにしたのはこれが初めてである。また、浸透圧上昇における生産性上昇が種々報告されているが (Oh et al., 1993; Park, Lee, 1995; Ryu et al., 2001; Zhang et al., 2010), 本検討では変動がみられなかった。

微生物が細胞壁を持つのに対して動物細胞は細胞膜で構成されており、物理的な環境因子の影響を受けやすいことから培養研究では古くより物理的な応力に関して検討されてきた。浸透圧はその一つの重要な因子であり、生体の浸透圧が 320 mOsm/kg 前後であることから多くの市販培地はこの前後の浸透圧に調整されてきた。例えば、IMDM;282, Serum;290, RPMI-1640;305,  $\alpha$ -MEM;305, DMEM;329 mOsm/kg である。また、一般に Hybridoma 細胞や CHO 細胞では、浸透圧が高い時に比生産速度 [specific production rate: SPR (pg/cell/d)] が高いことが知られており市販培地の中には 350 mOsm/kg 程度の高い浸透圧に調整された CD-Hybridoma 培地なども存在する。私の知るところでは、糖鎖パターンの制御に浸透圧が使われた例は無い。実際に、Kimura と Miller は、培養中の浸透圧が CHO 細胞で発現されたティシュープラスミノゲンの単糖組成に影響しなかったことを報告している (Kimura, Miller, 1997)。なぜ、浸透圧の影響の差が観察されるかわからないが、細胞や発現タンパクの違いが原因かもしれない。

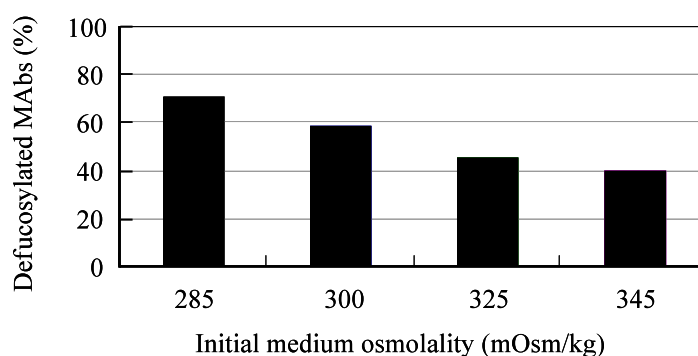


Figure 6. Dependence of MAb defucosylation levels (deFuc%) produced by YB2/0 cells on initial medium osmolality. The medium was diluted with distilled water to attain the indicated osmolality at the beginning of the culture. Fed-batch method was used in a 5-L bioreactor. Independent experiments under similar conditions exhibited similar results in 1-L bioreactors.

---

#### 3.4.2. フェドバッチ途中での希釈の deFuc%への影響

---

培地浸透圧と deFuc%の逆相関は、YB2/0 細胞の Fed-batch 中の加水希釈でも再現された。浸透圧は、pH 調整のためのアルカリの添加、アミノ酸、グルコースなどを含む Feed の添加、副産物や生産物の蓄積など様々な培養因子に影響される。先の検討により deFuc%の制御には浸透圧が有効な因子であろうことが判ってきたが、実際のフェドバッチ培養工



程で採用するためにはいくつかの課題が考えられる。そこで、まずはフェドバッチ培養の途上で浸透圧変化を加えることで実際に deFuc%に変動が起こるかの初期検討を実施した。5-LリアクターでのFed-batchのために、培地を290と340 mOsm/kgに加水調整した。浸透圧の変更には槽内に加水することにより培養途上で浸透圧を下げる培養法を採用し、5-Lバイオリアクターで試みた。ここまでの検討は全て初発浸透圧による変動を検討したものであり、浸透圧変化による糖鎖中の単糖組成への応答が遅ければ工程上の制御は困難となる。初発浸透圧340 mOsm/kgで培養を開始した後、培養6日目で加水希釈し浸透圧を290 mOsm/kgに調整した。その結果、浸透圧制御によってdeFuc%が20%上昇制御された。この値は初発浸透圧290 mOsm/kgで培養を開始した対照試験区とほぼ同様の値となった。これらの結果からdeFuc%は、初期培地の浸透圧のみならず抗体を作っているフェーズであればいつでも浸透圧の制御によって品質制御できる可能性を示した。また、データは初期培養の変動の如何にかかわらず、培養中盤から制御方針を変化できることを示している。グルコースは動物細胞培養に用いられる主要基質の一つで、動物細胞培養には欠くことができない栄養源である。同時に、先述の結果が示す通り、グルコースは浸透圧を上昇させる主要因子の一つである。ただし、同様に浸透圧を上昇させる主要因子であるNaClと異なり、最も効率良く燃焼された際に一部はCO<sub>2</sub>となって系外に排出されることから ( $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6H_2O + 6CO_2$ )、細胞存在下での過剰グルコースによる浸透圧の上昇は一過性の浸透圧上昇と考えられる。一般の動物細胞培養では培養後期に乳酸やアンモニアなど培養副産物が発生し浸透圧が上昇する。高密度培養を達成するFed-batch培養ではこの傾向が顕著であり短所の一つであるが、過剰グルコースによる浸透圧調整によって浸透圧の低減・維持が期待された。この効果が浸透圧の制御法の開発に多大な効果をもたらした点に関しては後述する。

これまでdeFuc%の制御は宿主細胞のエンジニアリングによるものが主であった。たとえば、ノックアウト手法を用いてフコース転移酵素 *FUT8* (Yamane-Ohnuki et al., 2004)、GMDの供給酵素 *GMD* (Kanda et al., 2007)への応用例が知られる。siRNAによる阻害では、同じく *FUT8* (Mori et al., 2004)、フコースのゴルジ体への供給体であるGDP-フコースのトランスポーター *GFT* (Omasa et al., 2008)の抑制が知られる。また、グリコシダーゼ阻害剤も報告されている (Zhou et al., 2008)。しかしながら、培養プロセスにおける実用的なアプローチは未だ無い。

---

### 3.4.3. 他細胞（NS0，SP2/0細胞）での deFuc%への影響

---

培地浸透圧と deFuc%の逆相関は、YB2/0細胞に加えて他の細胞でも再現された。上市されている抗体医薬品製造にはCHO細胞、とマウスミエローマ細胞であるNS0細胞、SP2/0細胞が採用されている。ADCCの品質制御のために deFuc%の制御が重要であることから、YB2/0で示された浸透圧の影響が他の工業利用細胞でどのような挙動を示すか知ることは極めて重要である。それゆえ、NS0とSP2/0細胞培養への浸透圧の影響を調べた (Fig. 7)。3種類の細胞間で浸透圧と deFuc%の影響の度合いこそ異なるものの、培地浸透圧と deFuc%の逆相関はNS0細胞、SP2/0細胞そしてYB2/0細胞で対極には同じ傾向を示した。

ADCC活性が主薬効の抗体を開発する際には、宿主細胞を慎重に選択する必要がある。なぜならば、ADCC活性は deFuc%に大きく依存するからである。異なった宿主細胞は、異なった糖鎖生産能、特にフコース付加能に関して異なった能力を示しており、適した細胞を選択すべきである (Kanda et al., 2006; Shields et al., 2002; Shinkawa et al., 2003; Wurm, 2004)。QbDの方針に沿って考えれば、安定な工程制御のためには遺伝子改変された宿主細胞の選択が合理的である (Yamane-Ohnuki et al., 2004)。しかし、このような戦略がいつも必ず採用できるわけではない、昨今のバイオ医薬品の開発は創薬から申請まで12年にもおよび、しかも単一の会社で開発するケースが減少し、ベンチャーと大型グローバル企業など複数の企業がかかわることのほうがむしろ増えている (Steinmeyer, McCormick, 2008; Werner, 2004)。それゆえ、開発途上での宿主細胞の切り替えが必ず許容されるとは限らない。特に臨床データが多く蓄積された開発後期になればセルバンクの変更は同等性管理において一定のリスクを負うことになる。バイオ医薬では他にもマウスミエローマ NS0, SP2/0, ハムスター CHO, BHK, イヌ MDCK, ヒト HEK293, MRC-5, and HT-1080のような多くの宿主細胞が知られ、培養条件による deFuc%の制御法をそれぞれの細胞で理解しておくことは極めて有用である。

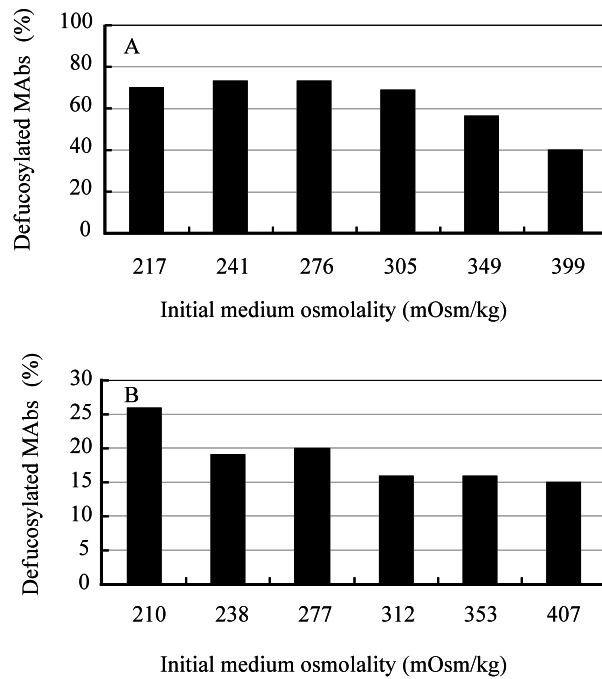


Figure 7. Dependence of defucosylation levels (deFuc%) of IgG1 MAbs produced from NS0 (A) and SP2/0 (B) cells on the initial medium osmolality. SP2/0 and NS0 cells were, respectively cultured in 1,000 mL cell culture bags (Medtronic, MN, USA) or 225 cm<sup>2</sup> T-flasks (AGC, Tokyo, Japan) in RPMI1640 medium (Lifetechnologies, CA, USA) supplemented with 10% Daigo's GF21 (Nihon-seiyaku, Osaka, Japan).

#### 3.4.4. 灌流（Perfusion）培養を用いた制御範囲の検討

パーフュージョン培養において、フィード培地の浸透圧を 260 – 330 mOsm/kg に任意に変化させることで、deFuc%を 45%から 85%で任意に制御し 33 日間培養した（Fig. 8）。図中に示すように培地の浸透圧を狙った浸透圧（◆）に 310, 270, 260, 240, 300, 330, 300 mOsm/kg の順で上げ／下げ制御することで、deFuc%（■）は上げ方向／下げ方向に任意に変化することが見出せた。このように培地浸透圧によって deFuc%は制御可能であったにもかかわらず、最低浸透圧 240 mOsm/kg に切り替えたところで、それまで 90%を超える数値で良好に推移していた生存率の低下が示された（Fig. 3.3B, C 矢印箇所）。このように蒸留水による希釈浸透圧制御には、培地組成物の変動と、なにより細胞が持つ生育能力に“制限”があることを留意せねばならない。

昨今の医薬品製造において、Bayer 社、Centocor 社などかねてより Perfusion 培養を採用して技術・経験的に円熟している少数の会社を除き、ほとんどはバリデーションなど

の観点から Batch, Fed-batch の工程を採用していると考えられる (Michel Chartrain, Chu, 2008). ここでは, 実験の都合により短時間で結果を得るためのツールとして Perfusion 培養を採用した. 流加培地浸透圧は加水希釈によって調整した. 培地切り替えた後, Centritech Lab II を用い実行容量 1L の槽内に新鮮培地 250 mL が 6 hr 毎に流入する設定 (Perfusion rate 1 v.v.d.), すなわち約 1 日で浸透圧が設定値に変動する条件で運転した. 21 日目で viability が 90% を下回ったので, 浸透圧を上げ方向への制御 300 mOsm/kg に切り替えた. 240 mOsm/kg 制御に切り替えた後の実測値では 280 mOsm/kg が示された. 恐らくストレス応答による乳酸などの産出にともなう浸透圧上昇が推測される.

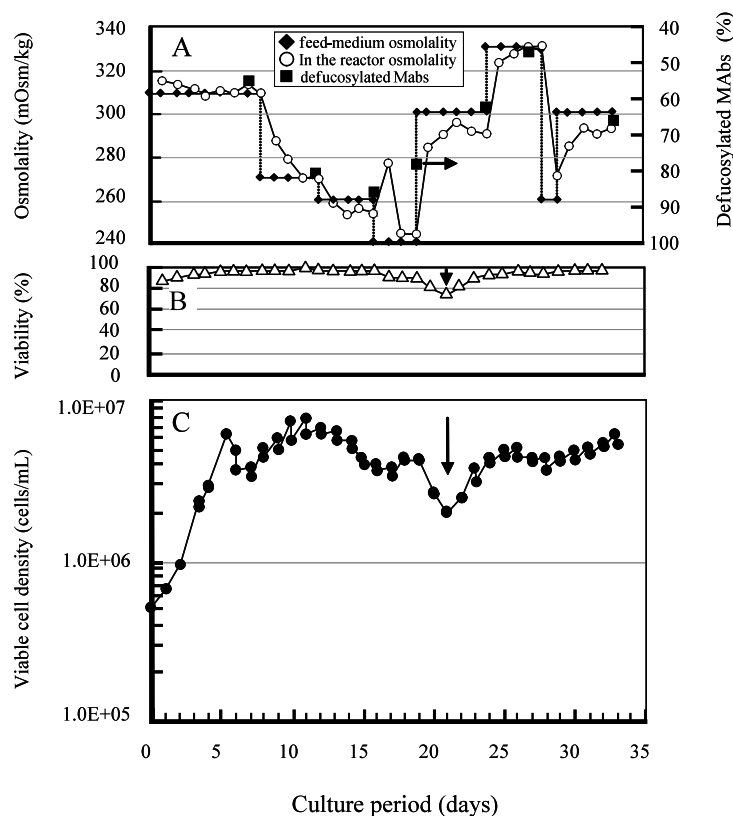


Figure 8. Defucosylation levels (deFuc%) of MAb produced by YB2/0 cells cultured in varied osmolalities. Cells were cultured by a perfusion method using a 1-L bioreactor with Centritech™ LabII system (Thermo, MA, USA) which enabled arbitrary changes in the medium osmolality. (A) Open circles, observed medium osmolality; closed diamonds, osmolality of feeding medium; closed squares, observed deFuc%. (B) Reactor cell viability (open triangle). (C) Reactor viable cell density (closed circles).

Reproducibility is ensured because several conditions were adopted, although reproducibility is just one aspect of perfusion culture.

---

#### 3.4.5. 種々の調圧剤による deFuc%への影響

---

浸透圧調整に用いた調圧剤の性質（イオン vs 非イオン，糖鎖合成基質 vs 非基質）によらず培地浸透圧と deFuc%の逆相関は維持された（Fig. 9）．浸透圧そのものが deFuc%に影響していることを確かめるために，イオンの影響（KCl と NaCl），基質（フコース，フルクトース，クレアチン），非極性（マンニトール）によって 320 から 250 mOsm/kg に加水希釈した培にそれぞれ添加，調整して 37°C で 11，12 日間培養した．驚くべきことに，培地浸透圧と deFuc%の逆相関は化合物によらず相関係数： $r^2 = 0.92$  という高い相関を示した．さらには，細胞生理の基幹であろう  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  の比率の変化も影響しなかった．また，フコースが他の物質と同じ効果を持つことは一見不思議だが，動物細胞培養では糖鎖へのフコース供給源である GDP-フコースの 90% はフリーのフコースではなく，GDP-マンノースから合成されることが報告されている (Becker, Lowe, 2003)．また，浸透圧が比タンパク生産速度に影響し，その浸透圧調整に使用する化合物によって影響が異なることが報告されているが (Coroadinha et al., 2006a)，浸透圧調整物質の種類に影響されない本研究の deFuc%とは対照的である．

QbD のアプローチのコンセプトは非常に有益であるにもかかわらず，我々細胞培養担当者が実行に移すのは容易ではない．細胞培養のパラメータは非常に複雑に絡んでいるからである．それゆえ，通常は包括的に事象をとらえて実験計画法のアプローチが採られる (Abu-Absi et al., 2010; Horvath et al., 2010)．このような状況下で，製品品質へ影響する典型的なパラメータとなる可能性がある deFuc% を培地の浸透圧という直接的に調製できるパラメータで制御できることを見出したことは，安定した薬効薬理の製剤を市場に届ける責任を果たすために極めて有益であり，明快である．

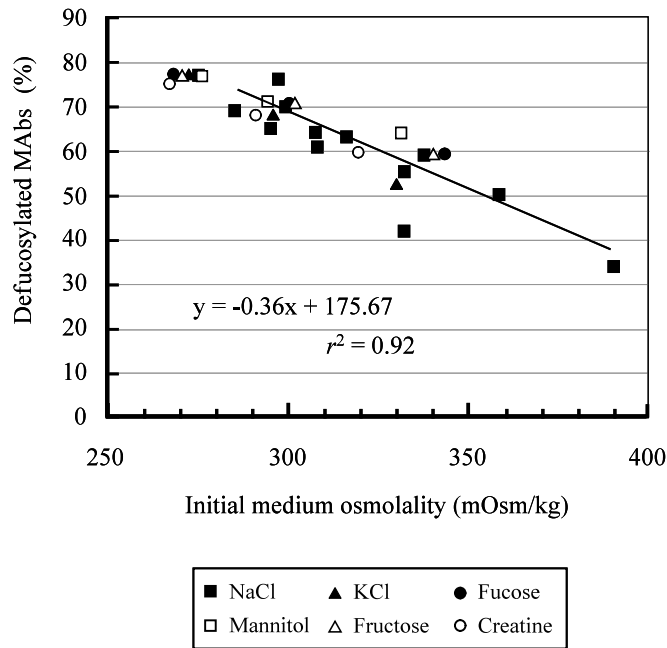


Figure 9. Relationship between defucosylation levels (deFuc%) of MAbs produced and medium osmolalities attained by supplementing with different compounds: closed squares, NaCl; closed triangles, KCl; closed circles, fucose; open squares, mannitol; open triangles, fructose; open circles, creatine. Cells were cultured in 250-mL Erlenmeyer flasks (Corning, NY, USA) for 11 days.

#### 3.4.6. 計算法の見直し

以上の検討から、YB2/0 細胞株の発現する抗体糖鎖の単糖組成は浸透圧依存的に変動することが示された。先述までの実験群のデータ解析に用いてきた浸透圧の値は、暫定的に初発培地の浸透圧や培養最終日の浸透圧など 11 日にもおよぶ培養の一点をプロットしたものであり、培養途上での浸透圧変化を加味していない。

本検討に用いた IgG1 キメラ抗体の生産 YB2/0 細胞株の特徴として、CCD ( $10^6$  cells  $\times$  d/mL) と生産される IgG1 キメラ抗体 (mg/L) との間に直線的な相関があり生産性が増殖に良く相関することが過去の検討から判っている。生細胞密度の時間積分で与えられる累積細胞密度はほぼ IgG1 キメラ抗体の生産濃度とみなすことができる。一般に、Fed-batch 培養において、浸透圧は培養初期から後期に向かって副産物などの蓄積により上昇する傾向がある。抗体糖鎖が発現分泌後に培養上清中では修飾を受けず、抗体糖鎖が

それぞれの培養フェーズの浸透圧により影響されて発現分泌されていると仮定すると、全培養日程を終了した抗体糖鎖の単糖組成は、各培養フェーズの浸透圧とその区間で生産される抗体量の総和で表現されると仮定できる。

以上の仮定より、①IgG1 キメラ抗体生産 YB2/0 株の倍化時間はほぼ 24 時間であること、培養途上の温度シフト、pH シフト検討において乳酸濃度の応答、浸透圧の応答には約 2 日を要したことから各日 2 日前の浸透圧による補正、②全日程の浸透圧の単純平均の利用、③各区間生産抗体量（すなわち全 CCD に対する CCD の分率%）を加味した浸透圧で再度プロットを比較した。その結果、②平均、③各区間生産抗体量補正による浸透圧値を用いた場合に相関係数は  $r^2 = 0.81$  から  $r^2 = 0.95$  に向上した。②の平均が良好な相関を示したのは急激な浸透圧変動が無かったことに由来すると考える。自発的に浸透圧を制御するのであれば③の手法が有効であると考え、以降のプロットには本手法を用いることにした。

---

#### 3.4.7. 各種培養データのプロット

---

イオン非依存的な浸透圧の応答は未解明であるが、例えば TRPV4（Transient receptor potential vanilloid 4）は、細胞が低浸透圧で膨れると活性化することが知られるチャネルである（鈴木，2005）。低浸透圧以外にも、圧力や流れによる shear stress に反応する。工業的な生産において、スケールアップは種々の細胞生理的な物理的な変化を強いる。たとえば槽の深さ／幅比、槽のサイズ、翼のタイプ、ガススパージャーの孔径など。そのほかにも、液量の増大に対して気液交換面積が減少することから、溶存炭酸ガス（ $dCO_2$ ）の蓄積がスケールアップにより生じることが、よく知られている（Matsunaga et al., 2009）。その結果、 $dCO_2$  が上昇し、細胞内の変化によって抗体生産量が低下することが、いくつかの細胞で知られている（deZengotita et al., 1998; Goudar et al., 2007; Zhu et al., 2005）。そこで圧力や流れ  $dCO_2$  の変化を考慮して、1, 5, 30, 400-L とサイズだけでなく、縦横比、攪拌翼形状、加圧／非加圧の異なった 4 つのリアクターの培地浸透圧と deFuc% の相関をプロットした（Fig. 10）。培地浸透圧と deFuc% の逆相関は良好に維持され相関係数は： $r^2 = 0.79$  であった。以上より deFuc% は槽のサイズや物理的な環境に変化が生じて浸透圧変化ほどの影響は受けないことを示した。

細胞培養プロセス開発に関する既存の報告では、糖鎖付加数、分岐鎖数、シアル酸付加数やシアル酸種（*N*-アセチルノイラミン酸 vs. *N*-グリコリルノイラミン酸）について議論されてきており、前述の  $dCO_2$  ばかりでなく (Kimura, Miller, 1997; Oliveira et al., 2008; Zanghi et al., 1999), アンモニア, pH, 溶存酸素, 温度, 培養停止タイミングの影響が見出されている (Butler, 2006; Goochee et al., 1991; Hossler et al., 2009). しかしこのような因子の deFuc% への影響について報告した例は無い. 本検討によれば, 培地浸透圧と deFuc% の逆相関は培養スケールにも影響されない堅牢性のある指針になるものと期待させる.

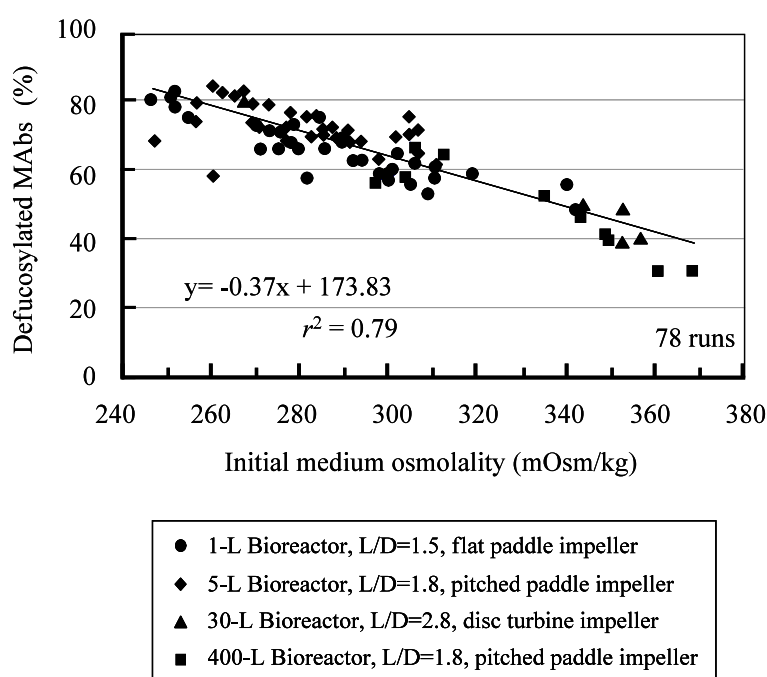


Figure 10. Relationship between the defucosylation levels (deFuc%) and the initial medium osmolalities analyzed under four culture scale conditions. MAbs were produced under 78 different physical conditions: four reactor size (1, 5, 30, and 400 L) each with different blades and aspect ratios (L/D), as well as different osmolalities, for 11 to 12 days in fed-batch cultures.

#### 3.4.8. YB2/0 細胞フェドバッチ培養の RT-PCR 分析

半定量的な RT-PCR を用いてフコース付加の肝となる *FUT8* と *GMD* の mRNA の発現解析を 11 日間の 400-L 槽 Fed-batch 培養で実施した (Fig. 11). ハウスキーピング遺伝子で



あるベータアクチンで規格化したところ、培養6日目以降浸透圧が300から450 mOsm/kgへ増大したことに伴い、*FUT8*は培養初期に較べて約8倍と著しく発現増大した。それに対して、*GMD*の増大は顕著ではなかった。この結果より、培地浸透圧と deFuc%の逆相関はフコース転移酵素活性の増減によるものであることが示された。本結果からさらに広げて、フコースと解糖系の代謝解析を高/低浸透圧の比較サンプルを用いて実施した。

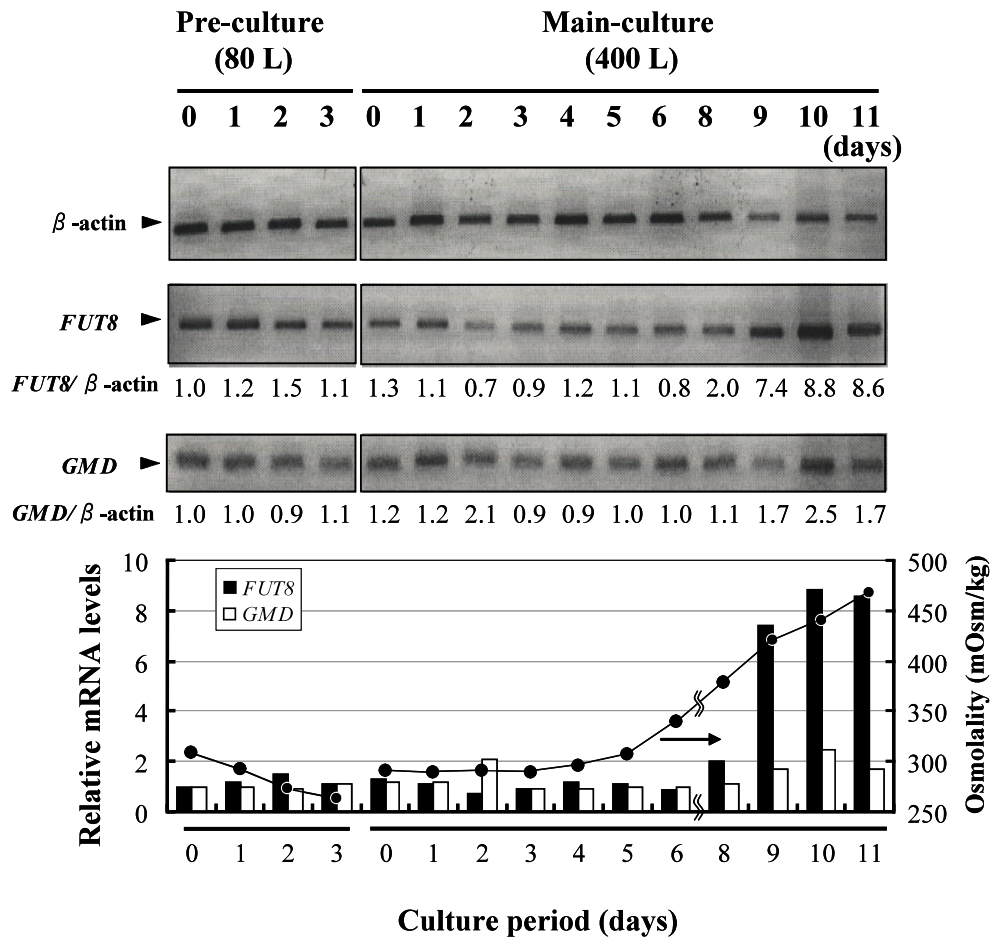


Figure 11. RT-PCR analysis of cultured YB2/0 cells in 80-L pre-culture and 400-L main fed-batch culture in bioreactors. *FUT8* and *GMD* transcript amounts relative to  $\beta$ -actin, calculated from the fluorescence intensity of each band measured by FluoroImager SI, are shown below the RT-PCR panels. Two independent experiments under similar conditions exhibited similar results.

### 3.4.9. 培地浸透圧が及ぼす GDP-フコース代謝経路の発現解析

高い浸透圧条件下に比較して、低い浸透圧条件では、*FUT8* の発現低下、GDP-フコース合成経路酵素群の遺伝子の発現低下、そして解糖系遺伝子群の発現低下が確認された。高/低浸透圧（410/250 mOsm/kg）の条件で培養したサンプルを比較マイクロアレイ解析し、注目した遺伝子群について RT-PCR を実施した。cDNA は、低浸透圧 250 mOsm/kg、高浸透圧 410 mOsm/kg の条件下で、マウスヒトキメラ IgG1 抗体 B を発現する YB2/0 細胞の 1-L フェドバッチ培養 6、9、11、12 日目のサンプルから調製した。マイクロアレイ解析では低浸透圧条件において、解糖系に関連する遺伝子群に低下傾向が見られ、特にアルドラーゼ、ピルビン酸キナーゼおよび乳酸デヒドロゲナーゼが低下していた（データ非表示）。この結果は、既存の浸透圧影響に対するプロテオーム、転写因子解析を支持する (Shen, Sharfstein, 2006; Shen et al., 2010)。次に注目した遺伝子群について RT-PCR を用いて発現解析を進め、高浸透圧に対する低浸透圧の発現比を Table 3 に示した。3 つの差異が見出された。第一に、低浸透圧では、解糖系の鍵である酵素群のうち、グルコキナーゼヘキソキナーゼ I の強い抑制が見られた。Fig. 6 のケースとは対照的に、培養期間を通じて浸透圧の高低差の関係に変化が生じなかったことから、抑制値は培養期間を通じてあまり変化がなかった。グルコースの消費速度と乳酸の生産速度は低浸透圧下で低いにもかかわらず、細胞の生育や生存率には大きな差はなかった（データ非開示）。これらの結果から、グルコースと乳酸の比消費速度と比生産速度は低浸透圧条件下で下がっていると示唆される。第二に、GDP-フコースの供給経路遺伝子群の発現も低下した。動物細胞において GDP-フコースの供給経路は、GDP-マンノースに由来する de novo の系と遊離フコースからのサルベージ経路の 2 つがある。HeLa 細胞を用いた合成経路の定量試験では、GDP-フコースの 90% は de novo の系で合成される (Becker, Lowe, 2003)。さらに、de novo 経路の *GMD* と (Table 4.)、サルベージ経路のフコースキナーゼの (Table 4.) が低浸透圧で減少していた。これらは GDP-フコースの供給が低浸透圧では制限されていることを示している。第三に、GDP-フコースを基質に抗体に糖鎖を付加する *FUT8* そのものの発現が低浸透圧条件下で顕著に抑制された。これらの結果は、適切な培地浸透圧による deFuc% の制御が ADCC 活性の安定な抗体の製造において必須であることを示している。蛋白医薬の発現と糖鎖合成への浸透圧の影響については知られているが (Borys et al., 2010; del Val et al., 2010)、フコースに関する報告は無い。

Table 4. Gene expression ratio (hyposmotic vs. hyperosmotic conditions) during fed-batch culture as analyzed by RT-PCR

Gene Symbol	Culture periods (days)	6	9	11	12
	Gene name				
<i>Gck</i>	Glucokinase	0.14	0.11	0.15	0.13
<i>Hk1</i>	Hexokinase1	0.37	0.23	0.27	0.26
<i>Hk2</i>	Hexokinase2	0.88	0.72	0.94	0.44
<i>Hk3</i>	Hexokinase3	0.61	0.59	0.72	0.63
<i>Fpgt</i>	Fucose-1-phosphate guanylyltransferase	1.16	0.68	0.92	1.04
<i>Fuca</i>	Fucosidase, alpha-L-1	0.94	0.59	0.50	0.74
<i>Fuk</i>	L-fucose kinase	0.51	0.33	0.32	0.44
<i>Mpi</i>	Mannose phosphate isomerase	0.74	0.56	0.55	1.01
<i>Pmm1</i>	Phosphomannutase 1	0.83	0.45	0.77	0.33
<i>GMD</i>	GDP-mannose 4,6-dehydratase	1.05	0.74	0.78	0.89
<i>Fut1</i>	Fucosyltransferase 1	0.46	0.18	0.36	0.27
<i>Fut8</i>	Fucosyltransferase 8	0.29	0.04	0.18	0.12

#### 3. 4. 10. 糖鎖制御 Fed-batch 培養初期検討

以上の発見に基づいて、高い deFuc%抗体の製造を工業スケールで実現するシンプルな方法を検討した。抗体の工業製造においてフェドバッチは最も標準的な製造方法である。しかし、培養期間を通じて浸透圧を制御することは、多くの因子に影響され簡単ではない。pH調整のためのアルカリの添加、 $dCO_2$ の蓄積(それは培地のバッファー能にも影響する)、栄養成分の消費、生産物と副産物の蓄積が挙げられる。さらに、タンクサイズによって Feed 添加量の制限が生じるので、工業スケールではもはや希釈法は実現的ではない。よって、希釈をとまなわない浸透圧低下方法が必要である。そこで、NaCl 量を低減した特注粉末培地を採用した。我々はグルコース濃度を制御することによる浸透圧制御を試みた。初期に高濃度で添加されたグルコースは動物細胞培養で主たる基質として消費される(結果として浸透圧が下がる)。初期の高濃度グルコースは、培養経時とともに、グルコ

ースの消費にともなって低浸透圧を実現する (Fig. 12 A, ×記号) . 上げ方向の制御はグルコースを培養 6 日目に添加することで実現した (Fig. 12 , 白抜き記号) . 浸透圧一定の制御はグルコースほか栄養物を添加することで達成された (塗りつぶし記号) . 11 日目に回収された抗体の deFuc%は期待通りの逆相関が示された (Fig. 12 B, C) . 低浸透圧で, 最大の deFuc%を得た. これらの結果は, 浸透圧の制御によって deFuc%を制御した抗体糖鎖を工業レベルのフェドバッチ培養でも獲得できることを示した.

全世界で開発中のバイオ医薬品のうち 70%が糖蛋白であるとされる (Sethuraman, Stadheim, 2006). 一般に糖鎖のバラエティは, 糖鎖の付加数 (マクロなばらつき) と糖の分岐数など単糖の付加構造 (ミクロなばらつき) に大別される (Butler, 2006). 糖鎖は上市している糖タンパク医薬品の有効性を左右しうる critical な品質特性である (Hossler et al., 2009). 例えばアンチトロンビン製剤のヘパリン結合活性にフコースの有無が影響することが知られている (Louise Garone et al., 1996). 現段階では, 糖鎖合成経路の一連のすべての酵素を制御することは不可能である. しかし, グルコース溶液による培地浸透圧の制御は, YB2/0 細胞で生産する抗体が有効な ADCC 活性を保有するに必要な deFuc%をデザインするのに十分である. 本 deFuc%制御は同様の性質を持つ細胞株に広く使えることから, 安定な deFuc%の製造を広く達成することを実現し, これまで工業利用をあきらめていた細胞株の継続利用に道を開くかもしれない.

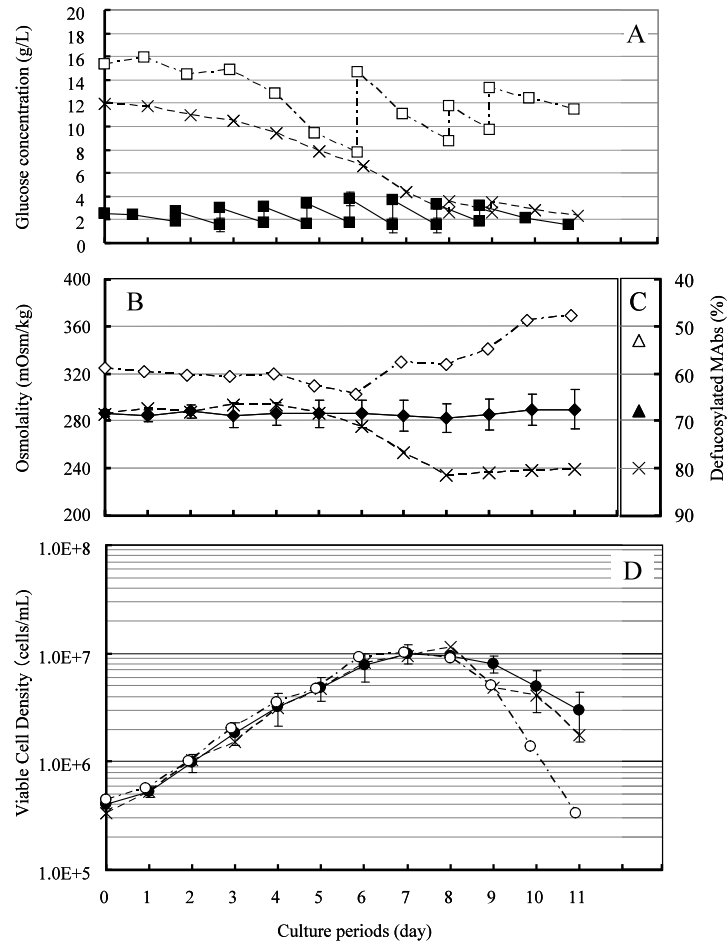


Figure 12. Defucosylation levels (deFuc%) of MAbs produced with different methods to regulate medium osmolality. Open symbols, hyperosmotic; cross symbols, hyposmotic; closed symbols, constant osmotic conditions. Cells were cultured in a 5-L fed-batch bioreactor with custom-made medium containing low NaCl. Osmolality was adjusted by supplementing with NaCl. (A) glucose concentration in the medium, (B) medium osmolality, (C) deFuc% MAbs harvested on day 11, and (D) viable cell density. Independent experiments under similar conditions exhibited similar initial results in 1-L bioreactors.

### 3. 5. 小括

---

以上， YB2/0 細胞で発現される抗体の ADCC 活性に深く関与するとされる抗体糖鎖中の deFuc%の制御を試みた。

抗体糖鎖中の deFuc%は， 浸透圧を能動的に変化させることで変動可能であることを複数の細胞株（ NS0 ， SP2/0 ）を用いて示した。 抗体糖鎖中の deFuc%と浸透圧が示す逆相関は， 浸透圧を調整する物質に因らないこと， 物理的な応力の変化に因らないことを示した。 浸透圧の高低は， 糖合成経路， 糖鎖合成経路の発現レベルに影響していることを明らかにした。 これらの発見に基づいて浸透圧の制御により抗体医薬品の標準製造法となっている Fed-batch 培養法で deFuc%を堅牢に制御できることを本研究で示した。

なお， 本研究の成果を基に， 浸透圧による糖鎖制御法として特許を出願した（ W0/2006/109781 ）。

## 第 4 章 総括

---

動物細胞による物質生産は、抗体医薬品の成功を支える生産技術となっている。両刃の剣として、生産コストは将来の医療経済を脅かす存在となっており、生産性の増大、薬効の増強が課題である。大きな設備の投資必要時期と、臨床試験の進行による必要供給量の確定時期のミスマッチは、バイオ医薬の広範な展開のブレーキの一つである。抗体医薬品の大きな投与量は、確率的に有害事象のリスク増大、高濃度化による凝集体の懸念、長い投与時間による患者様の不利益など、広範な産業化するためには課題がある。動物細胞による生産宿主細胞としては CHO 細胞が主流であるが、YB2/0 細胞で生産される抗体の細胞傷害活性（ADCC）が高いことから、YB2/0 細胞の製造への応用検討は有益である。しかし、YB2/0 細胞に関する培養工学的な検討は 1990 年初めにいくつかの報告がみられるにとどまっていた。

本研究では、YB2/0 細胞を検討モデルに用いて、SP2/0、NS0、CHO 細胞での汎用性を確認しながら生産性増強因子の探索、および生産抗体の ADCC 活性を定義する抗体糖鎖中のフコースの含量を一定に制御する製造方法の開発を目的に、生産性と、活性の両面から工程を構築することにより効率的に物質を生産することを目的として検討を行った。

まず第 2 章では、YB2/0 細胞を用いて生産性増強因子のスクリーニングを試みた。各種抗酸化剤などを用いることにより、CoQ<sub>10</sub> に比細胞生産性を増強効果があることを見出した。その効果は、生産物の活性に影響しなかった。エネルギー生産系と深く関与し、DNA の酸化損傷の軽減を介さない機序であることを示した。第 3 章では、抗体医薬品の主活性のひとつである ADCC 活性を培養工程の制御因子である浸透圧により直接的に制御することを見出した。物質非依存的な浸透圧の応答であることを示した。以上のことから、YB2/0 細胞をモデルに他細胞への汎用性確認を含めて、CoQ<sub>10</sub> による比生産性を高めた培養方法を構築し、さらには浸透圧の制御による deFuc%管理によって、目的とした ADCC 活性に制御する培養方法を構築し工業生産への実用性を見出したと考えている。

CoQ<sub>10</sub> で生産性が向上するメカニズムは不明であるので、今後、アレイ解析などによりそのメカニズムが明らかになれば、生産性を更に向上させる添加剤の発見につながる可能

性がある。また、CoQ<sub>10</sub>存在下での低浸透圧培養により、生産性と deFuc%両方の向上が達成されるかを確認する必要がある。浸透圧は生体において10%の変化で死に至る可能性があるパラメータで有るにもかかわらず、物質非依存的な浸透圧の応答メカニズムは細胞ばかりでなく原核細胞でも未解明である。本研究は生産性の制御法としてだけでなく、細胞生理学的な情報も提供すると考えている。糖鎖、特にフコースは1996年のFUT8の単離から、2003年に抗体のADCC活性との強い関与が報告されて以降、医療的な有用性の解明が急速に進んでいる(Ishida et al., 2010)。フコースが無いことが有用なタンパクばかりではなく、付与が必要なタンパクも発見されており(Gao, Taniguchi, 2010; Lee et al., 2006)、生産物の有用性が増すとともに、オンオフの制御が可能である本制御の応用範囲は今後広まると期待される。

本技術の応用が、医療費肥大化の抑制、過大な製造設備とその投資タイミングのリスク低減、製品品質の安定によるマネジメントリスクの低減、投与量の低減による毒性リスクの低減など、ノウハウ産業とされるバイオ医薬品の広範な問題の解消に寄与することを願っている。



## 第 5 章 本論文に関する報文と特許出願

---

### 5.1. 関連論文

---

Konno Y, Aoki M, Takagishi M, Sakai N, Koike M, Wakamatsu K, Hosoi S, Enhancement of antibody production by the addition of Coenzyme-Q<sub>10</sub>. *Cytotechnology*, 2011, 63, 163-170.

Konno Y, Kobayashi Y, Takahashi K, Takahashi E, Sakae S, Wakitani M, Yamano K, Suzawa T, Yano K, Ohta T, Koike M, Wakamatsu K, and Hosoi S, Fucose content of monoclonal antibodies can be controlled by culture medium osmolality for high ADCC activity. *Cytotechnology* (印刷中).

### 5.2. 関連特許

---

Ogawa T, Konno Y, et al. (1999), WO/01/29246, US20090203078, Process for producing polypeptide.

Konno Y, Aoki M, et al. (2001), WO/03/046174, Process for producing substance.

Konno Y, Kobayashi Y, et al. (2006). WO/2006/109781, Process for production of glycoprotein composition.

Konno Y, Sakai N, et al. (2006), WO/2007/049567, Method for production of substance.

Konno Y, Sakai K, et al. (2008), WO/2008/069244, Process for producing glycoprotein composition.

### 5.3. 学会発表

---

2008 JAACT poster , Konno Y, Kobayashi Y, Takahashi K, Sakae S, Takahashi E, Wakitani M, Suzawa T, Yano K, Koike M, Wakamatu K, and Hosoi S, Control of fucosylation in cell culture antibody production by osmolality.

2009 ESACT poster , Konno Y, Kobayashi Y, Takahashi K, Sakae S, Wakitani M, Suzawa T, Yano K, Koike M, Wakamatu K, and Hosoi S, Controlling fucosylation levels of antibodies with osmolality during cell culture in several host cell lines.

2010 JAACT symposium , Konno Y, Kano K, and Tsumura H, One aspect for consideration, economics for cell culture process.

### 5.4. 参考論文

---

Kanda Y, Yamane-Ohnuki N, Sakai N, Yamano K, Nakano R, Inoue M, Misaka H, Iida S, Wakitani M, Konno Y, Yano K, Shitara K, Hosoi S, Satoh M. Comparison of cell lines for stable production of fucose-negative antibodies with enhanced ADCC. *Biotechnol Bioeng.* 2006 94:680-688.

## 第 6 章 謝辞

---

本研究を進めるにあたり，多くの方々に御世話になりました．ここに記して感謝の意を表します．

研究活動全般にわたり格別なるご指導とご高配を賜りました群馬大学工学系研究科若松馨教授に心から謝意を表します．

本論文の作成にあたり有益なご助言とご指導をいただきました窪田健二教授，外山准教授，行木信一准教授，井上祐介准教授に感謝申し上げます．

社会人学生生活においてサポートをいただきました飯塚靖子博士，研究室の皆様感謝申し上げます．

通学の機会を賜り、ご指導いただきました協和発酵キリン株式会社，佐藤光男抗体研究所所長（当時），山谷純バイオ生産技術研究所所長（当時），大橋秀哉バイオ生産技術研究所所長，津村治彦主任研究員をはじめ投稿論文共著者の皆様，同僚の皆様に心より感謝申し上げます．

分析業務全般に渡ってご尽力いただいた 倉田和美氏，脇谷雅子氏，高橋憲行氏，鈴木恵理氏，平石敬子氏，久保田愛氏，神垣昌世氏，土方千草氏，柴崎直美氏にこの場を借りて，お礼申し上げます．

最後になりましたが，博士課程に進学する機会を与え，ありとあらゆる場面で私を温かく見守り続けてくれた家族 弘子，里咲，幹大に感謝します．

以上

## 第 7 章 参考文献

---

- Abu-Absi SF, Yang L, Thompson P et al (2010) Defining process design space for monoclonal antibody cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 106:894-905
- Adiguzel C, Iqbal O, Demir M et al (2009) European community and US-FDA approval of recombinant human antithrombin produced in genetically altered goats. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 15:645-651
- Allen MJ, Boyce JP, Trentalange MT et al (2008) Identification of novel small molecule enhancers of protein production by cultured mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 100:1193-1204
- Arathoon W, Birch J (1986) Large-scale cell culture in biotechnology. *Science*, 232:1390-1395
- Arden N, Ahn S-h, Vaz W et al (2007) Chemical caspase inhibitors enhance cell culture viabilities and protein titer. *Biotechnology Progress*, 23:506-511
- Backliwal G, Hildinger M, Kuettel I et al (2008) Valproic acid: A viable alternative to sodium butyrate for enhancing protein expression in mammalian cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 101:182-189
- Balcarcel RR, Stephanopoulos G (2001) Rapamycin reduces hybridoma cell death and enhances monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 76:1-10
- Beck A, Wagner-Rousset E, Bussat MC et al (2008) Trends in glycosylation, glycoanalysis and glycoengineering of therapeutic antibodies and Fc-fusion proteins. *Curr Pharm Biotechnol*, 9:482-501
- Becker DJ, Lowe JB (2003) Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology*, 13:41R-53R
- Borys MC, Dalal NG, Abu-Absi NR et al (2010) Effects of culture conditions on N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) content of a recombinant fusion protein produced in CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 105:1048-1057
- Butler M, Huzel N, Barnabé N et al (1999) Linoleic acid improves the robustness of cells in agitated cultures. *Cytotechnology*, 30:27-36

- Butler M (2006) Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. *Cytotechnology*, 50:57-76
- Capstick PB, Garland AJ, Chapman WG et al (1965) Production of foot-and-mouth disease virus antigen from BHK 21 clone 13 cells grown and infected in deep suspension cultures. *Nature*, 205:1135-1136
- Carvalho AV, Santos SS, Calado J et al (2003) Cell growth arrest by nucleotides, nucleosides and bases as a tool for improved production of recombinant proteins. *Biotechnology Progress*, 19:69-83
- Chello M, Mastroroberto P, Romano R et al (1996) Protection by coenzyme Q<sub>10</sub> of tissue reperfusion injury during abdominal aortic cross-clamping. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 37:229-235
- Chen P, Harcum SW (2006) Effects of elevated ammonium on glycosylation gene expression in CHO cells. *Metabolic Engineering*, 8:123-132
- Coroadinha AS, Ribeiro J, Roldão A et al (2006a) Effect of medium sugar source on the production of retroviral vectors for gene therapy. *Biotechnology and Bioengineering*, 94:24-36
- Coroadinha AS, Silva AC, Pires E et al (2006b) Effect of osmotic pressure on the production of retroviral vectors: Enhancement in vector stability. *Biotechnology and Bioengineering*, 94:322-329
- del Val IJ, Kontoravdi C, Nagy JM (2010) Towards the implementation of quality by design to the production of therapeutic monoclonal antibodies with desired glycosylation patterns. *Biotechnology Progress*, 26:1505-1527
- deZengotita V, Kimura R, Miller W (1998) Effects of CO<sub>2</sub> and osmolality on hybridoma cells: growth, metabolism and monoclonal antibody production. *Cytotechnology*, 28:213-227
- deZengotita VM, Schmelzer AE, Miller WM (2002) Characterization of hybridoma cell responses to elevated pCO<sub>2</sub> and osmolality: Intracellular pH, cell size, apoptosis, and metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, 77:369-380
- Eguchi M (1984) The effect of Co-enzyme Q<sub>10</sub> on lactate metabolism during resuscitation from anoxia. *Masui*, 33:1329-1338

- Elton Stubblefield, Mueller GC (1960) Effects of sodium chloride concentration on growth, biochemical composition, and metabolism of HeLa cells. *Cancer research*, 20:1646-1655
- Farid SS, Washbrook J, Titchener-Hooker NJ (2007) Modelling biopharmaceutical manufacture: Design and implementation of SimBiopharma. *Computers & Chemical Engineering*, 31:1141-1158
- Franco R, Daniela G, Fabrizio M et al (1999) Influence of osmolarity and pH increase to achieve a reduction of monoclonal antibodies aggregates in a production process. *Cytotechnology*, 29:11-25
- Gao C, Taniguchi N (2010) 糖鎖と COPD. *生体の科学*, 61:128 - 134
- Gao IK, Noga SJ, Donnenberg AD (1992) Characterization of YB2/0 cell line by counterflow centrifugation elutriation. *Exp Toxicol Pathol*, 44:435-438
- Goochee CF, Gramer MJ, Andersen DC et al (1991) The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. *Biotechnology (N Y)*, 9:1347-1355
- Gorelick C, Lopez-Jones M, Goldberg GL et al (2004) Coenzyme Q<sub>10</sub> and lipid-related gene induction in HeLa cells. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 190:1432-1434
- Goudar CT, Matanguihan R, Long E et al (2007) Decreased pCO<sub>2</sub> accumulation by eliminating bicarbonate addition to high cell-density cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 96:1107-1117
- Han YK, Koo TY, Lee GM (2009) Enhanced interferon- $\beta$  production by CHO cells through elevated osmolality and reduced culture temperature. *Biotechnology Progress*, 25:1440-1447
- Han YK, Kim Y-G, Kim JY et al (2010) Hyperosmotic stress induces autophagy and apoptosis in recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 105:1187-1192
- Harada N (2008) Intracellular Ca<sup>2+</sup> measurements in living cells. *Equilibrium Research*, 67:81-88
- Hathcock JN, Shao A (2006) Risk assessment for coenzyme Q<sub>10</sub> (Ubiquinone). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45:282-288

- Hesse F, Wagner R (2000) Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures. *Trends in Biotechnology*, 18:173-180
- Hirofumi Tachibana, Hiroki Murakami, Hiroshi Shinmoto et al (1994) 糖蛋白質の生産方法. 特開平 6-292592
- Hodgson JM, Watts GF, Playford DA et al (2002) Coenzyme Q<sub>10</sub> improves blood pressure and glycaemic control: a controlled trial in subjects with type 2 diabetes. *Eur J Clin Nutr*, 56:1137-1142
- Horvath B, Mun M, Laird M (2010) Characterization of a monoclonal antibody cell culture production process using a Quality by Design approach. *Molecular Biotechnology*, 45:203-206
- Hossler P, Khattak SF, Li ZJ (2009) Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology*, 19:936-949
- Inoue Y, Fujisawa M, Kawamoto S et al (1999) Effectiveness of vitamin A acetate for enhancing the production of lung cancer specific monoclonal antibodies. *Cytotechnology*, 31:77-83
- Inoue Y, Fujisawa M, Shoji M et al (2000) Enhanced antibody production of human-human hybridomas by retinoic acid. *Cytotechnology*, 33:83-88
- Ishida T, Joh T, Uike N et al (2010) Multicenter Phase II study of KW-0761, a defucosylated anti-CCR4 Antibody, in relapsed patients with Adult T-cell Leukemia-Lymphoma (ATL). *ASH Annual Meeting Abstracts*, 116:285-
- Jiang Z, Sharfstein ST (2008) Sodium butyrate stimulates monoclonal antibody over-expression in CHO cells by improving gene accessibility. *Biotechnology and Bioengineering*, 100:189-194
- Kajiwara K (1984) A Study on Ubiquinone; Its effect on the metabolic changes in the brain caused by hypoxic hypoxia in rabbits. *J Nihon Univ med Ass*, 43:41-51
- Kanda Y, Yamane-Ohnuki N, Sakai N et al (2006) Comparison of cell lines for stable production of fucose-negative antibodies with enhanced ADCC. *Biotechnol Bioeng*, 94:680-688
- Kanda Y, Yamada T, Mori K et al (2007) Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc

- oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types. *Glycobiology*, 17:104-118
- Kazuo Shimada, Yoshinori Tsukamoto, Takahashi T (1999) 糖蛋白質の生産方法. 特開平 11-127890
- Keen MJ (1995) The culture of rat myeloma and rat hybridoma cells in a protein-free medium. *Cytotechnology*, 17:193-202
- Kelley B (2009) Industrialization of mAb production technology The bioprocessing industry at a crossroads. *mAbs*, 1:443-452
- Kenten JH, Boss MA (1986) Transformed myeloma cell-line and a process for the expression of a gene coding for a eukaryotic polyotic polypeptide employing same. WO 86/05807
- Kilmartin JV, Wright B, Milstein C (1982) Rat monoclonal antitubulin antibodies derived by using a new nonsecreting rat cell line. *J Cell Biol*, 93:576-582
- Kim D, Lee J, Chang H et al (2005) Effects of supplementation of various medium components on chinese hamster ovary cell cultures producing recombinant antibody. *Cytotechnology*, 47:37-49
- Kim MS, Kim NS, Sung YH et al (2002) Biphasic culture strategy based on hyperosmotic pressure for improved humanized antibody production in Chinese hamster ovary cell culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 38:314-319
- Kimura R, Miller WM (1996) Effects of elevated pCO<sub>2</sub> and/or osmolality on the growth and recombinant tPA production of CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 52:152-160
- Kimura R, Miller WM (1997) Glycosylation of CHO-Derived Recombinant tPA Produced under Elevated pCO<sub>2</sub>. *Biotechnology Progress*, 13:311-317
- Kishi T, Okamoto T, Takahashi T et al (1993) Cardiostimulatory action of coenzyme Q homologues on cultured myocardial cells and their biochemical mechanisms. *Journal of Molecular Medicine*, 71:S71-S75
- Kitano M, Hosoe K, Fukutomi N et al (2004) 28-Day repeated dose toxicity study of dried microorganism in rats. *Food Chem Toxicol*, 42:1817-1824
- Konno Y, Sakai N, Sakai K et al (2006) Method for production of substance. WO/2007/049567



- Lee M, Lee G (2001) Effect of hypoosmotic pressure on cell growth and antibody production in recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Cytotechnology*, 36:61-69
- Lee MS, Lee GM (2000) Hyperosmotic pressure enhances immunoglobulin transcription rates and secretion rates of KR12H-2 transfectoma. *Biotechnology and Bioengineering*, 68:260-268
- Lee MS, Kim KW, Kim YH et al (2003) Proteome analysis of antibody-expressing CHO cells in response to hyperosmotic pressure. *Biotechnology Progress*, 19:1734-1741
- Lee SH, Takahashi M, Honke K et al (2006) Loss of core fucosylation of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 impairs its function, leading to the upregulation of serum levels of insulin-like growth factor-binding protein 3 in Fut8<sup>-/-</sup> mice. *Journal of Biochemistry*, 139:391-398
- Libioulle C, Corbesier L, Gilles R (2001) Changes in major intracellular osmolytes in L-929 cells following rapid and slow application of hyperosmotic media. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 130:461-470
- Lifely MR, Hale C, Boyce S et al (1995) Glycosylation and biological activity of CAMPATH-1H expressed in different cell lines and grown under different culture conditions. *Glycobiology*, 5:813-822
- Ling WLW, Deng L, Lepore J et al (2003) Improvement of monoclonal antibody production in hybridoma cells by dimethyl sulfoxide. *Biotechnology Progress*, 19:158-162
- Liu C-H, Chen L-H (2007) Enhanced recombinant M-CSF production in CHO cells by glycerol addition: model and validation. *Cytotechnology*, 54:89-96
- Louise Garone, Tim Edmunds, Eric Hanson et al (1996) Antithrombin-heparin affinity reduced by fucosylation of carbohydrate at asparagine 155. *Biochemistry*, 35:8881-8889
- Mancuso M OD, Volpi L, Calsolaro V, Siciliano G. (2010) Coenzyme Q<sub>10</sub> in neuromuscular and neurodegenerative disorders. *Curr Drug Targets* 2010 Jan; 11:111-121
- Mao L, Hartl D, Nolden T et al (2008) Pronounced alterations of cellular metabolism and structure due to hyper- or hypo-osmosis. *Journal of Proteome Research*, 7:3968-3983

- Martin-Lopez A, Garcia-Camacho F, Contreras-Gomez A et al (2007) Enhanced monoclonal antibody production in hybridoma cells by LPS and Anti-mIgG. *Biotechnol Prog*, 23:1447-1453
- Matsunaga N, Kano K, Maki Y et al (2009) Estimation of dissolved carbon dioxide stripping in a large bioreactor using model medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107:419-424
- McNeeley K, Sun Z, Sharfstein S (2005) Techniques for dual staining of DNA and intracellular immunoglobulins in murine hybridoma cells: applications to cell-cycle analysis of hyperosmotic cultures. *Cytotechnology*, 48:15-26
- Michel Chartrain, Chu L (2008) Development and production of commercial therapeutic monoclonal antibodies in mammalian cell expression systems. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9:447-467
- Michiels JF, Barbau J, De Boel S et al (2011) Characterisation of beneficial and detrimental effects of a soy peptone, as an additive for CHO cell cultivation. *Process Biochemistry*, 46:671-681
- Millistein (1981) Improvements in or relating to rat myeloma cell lines. GB2709313
- Mimura Y, Lund J, Church S et al (2001) Butyrate increases production of human chimeric IgG in CHO-K1 cells whilst maintaining function and glycoform profile. *Journal of Immunological Methods*, 247:205-216
- Miyazaki Y, Nishimoto S, Sasaki T et al (1998) Spermine enhances IgM productivity of human-human hybridoma HB4C5 cells and human peripheral blood lymphocytes. *Cytotechnology*, 26:111-118
- Molowa DT (2001) The State of biologics manufacturing. JPMorgan Securities Inc Equity research Industry analysis:1-12
- Mori K, Kuni-Kamochi R, Yamane-Ohnuki N et al (2004) Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize effector function of produced antibodies using FUT8 siRNA. *Biotechnology and Bioengineering*, 88:901-908
- Mori K, Iida S, Yamane-Ohnuki N et al (2007) Non-fucosylated therapeutic antibodies: the next generation of therapeutic antibodies. *Cytotechnology*, 55:109-114

- Navas P, Fernandez-Ayala DM, Martin SF et al (2002) Ceramide-dependent Caspase 3 Activation is Prevented by Coenzyme Q from Plasma Membrane in Serum-deprived Cells. *Free Radical Research*, 36:369-374
- Ochiai A, Itagaki S, Kurokawa T et al (2007) Improvement in intestinal coenzyme Q<sub>10</sub> absorption by food intake. *Yakugaku Zasshi*, 127:1251-1254
- Oh HK, So MK, Yang J et al (2005) Effect of *N*-acetylcystein on butyrate-treated chinese hamster ovary cells to improve the production of recombinant human interferon-beta-1a. *Biotechnology Progress*, 21:1154-1164
- Oh SK, Vig P, Chua F et al (1993) Substantial overproduction of antibodies by applying osmotic pressure and sodium butyrate. *Biotechnol Bioeng*, 42:601-610
- Oliveira J, Damiani R, Vorauer-Uhl K et al (2008) Influence of a reduced CO<sub>2</sub> environment on the secretion yield, potency and *N*-glycan structures of recombinant thyrotropin from CHO cells. *Molecular Biotechnology*, 39:159-166
- Omasa T, Tanaka R, Doi T et al (2008) Decrease in antithrombin III fucosylation by expressing GDP-fucose transporter siRNA in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106:168-173
- Omasa T, Furuichi K, Iemura T et al (2010) Enhanced antibody production following intermediate addition based on flux analysis in mammalian cell continuous culture. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33:117-125
- Øyaas K, Ellingsen TE, Dyrset N et al (1994) Utilization of osmoprotective compounds by hybridoma cells exposed to hyperosmotic stress. *Biotechnology and Bioengineering*, 43:77-89
- Ozturk SS, Palsson BO (1991) Effect of medium osmolarity on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 37:989-993
- Park SY, Lee GM (1995) Enhancement of monoclonal antibody production by immobilized hybridoma cell culture with hyperosmolar medium. *Biotechnology and Bioengineering*, 48:699-705
- Park T-J, Seo H-K, Kang B-J et al (2001) Noncompetitive inhibition by camphor of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology*, 61:787-793
- Portakal O, Özkaya Ö, Erden inal M et al (2000) Coenzyme Q<sub>10</sub> concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients. *Clinical Biochemistry*, 33:279-284

- Richter C, Park JW, Ames BN (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85:6465-6467
- Ryll T (2003) Mammalian cell culture process for producing glycoproteins. *US 6,528,286 B1*
- Ryu JS, Lee GM (1999) Application of hypoosmolar medium to fed-batch culture of hybridoma cells for improvement of culture longevity. *Biotechnology and Bioengineering*, 62:120-123
- Ryu JS, Kim TK, Chung JY et al (2000) Osmoprotective effect of glycine betaine on foreign protein production in hyperosmotic recombinant Chinese hamster ovary cell cultures differs among cell lines. *Biotechnology and Bioengineering*, 70:167-175
- Ryu JS, Lee MS, Lee GM (2001) Effects of cloned gene dosage on the response of recombinant CHO cells to hyperosmotic pressure in regard to cell growth and antibody production. *Biotechnology Progress*, 17:993-999
- Satoh M, Shitara, K., and Hanai, N. (2006) The current stream and prospect of glycoscience application. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 18:129-136,
- Schmelzer AE, Miller WM (2002a) Effects of osmoprotectant compounds on NCAM polysialylation under hyperosmotic stress and elevated pCO<sub>2</sub>. *Biotechnology and Bioengineering*, 77:359-368
- Schmelzer AE, Miller WM (2002b) Hyperosmotic stress and elevated pCO<sub>2</sub> alter monoclonal antibody charge distribution and monosaccharide content. *Biotechnology Progress*, 18:346-353
- Sengupta N, Rose ST, Morgan JA (2011) Metabolic flux analysis of CHO cell metabolism in the late non-growth phase. *Biotechnology and Bioengineering*, 108:82-92
- Sethuraman N, Stadheim TA (2006) Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 17:341-346
- Shen D, Sharfstein ST (2006) Genome-wide analysis of the transcriptional response of murine hybridomas to osmotic shock. *Biotechnology and Bioengineering*, 93:132-145
- Shen D, Kiehl TR, Khattak SF et al (2010) Transcriptomic responses to sodium chloride-induced osmotic stress: A study of industrial fed-batch CHO cell cultures. *Biotechnology Progress*, 26:1104-1115

- Shields RL, Lai J, Keck R et al (2002) Lack of fucose on human IgG1 *N*-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ<sub>3</sub>RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem*, 277:26733-26740
- Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N et al (2003) The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting *N*-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem*, 278:3466-3473
- Shitara K, Nakamura K, Tokutake-Tanaka Y et al (1994) A new vector for the high level expression of chimeric antibodies in myeloma cells. *Journal of Immunological Methods*, 167:271-278
- Shults CW, Flint Beal M, Song D et al (2004) Pilot trial of high dosages of coenzyme Q<sub>10</sub> in patients with Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 188:491-494
- Sigin Zhaorigetu, Masahiro Sasaki, WHiromitsu Watanabe et al (2001) Supplemental silk protein, Sericin, suppresses colon tumorigenesis in 1,2-dimethylhydrazine-treated mice by reducing oxidative stress and cell proliferation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 65:2181-2186
- Simmons LC, Reilly D, Klimowski L et al (2002) Expression of full-length immunoglobulins in *Escherichia coli*: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 263:133-147
- Singh RB, Wander GS, Rastogi A et al (1998) Randomized, double-blind placebo-controlled trial of coenzyme Q<sub>10</sub> in patients with acute myocardial infarction. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 12:347-353
- Soja AM, Mortensen SA (1997) Treatment of congestive heart failure with coenzyme Q<sub>10</sub> Illuminated by meta-analyses of clinical trials. *Molecular Aspects of Medicine*, 18:159-168
- Sommerfeld S, Strube J (2005) Challenges in biotechnology production--generic processes and process optimization for monoclonal antibodies. *Chemical Engineering and Processing*, 44:1123-1137
- Soo Ryu J, Min Lee G (1997) Effect of hypoosmotic stress on hybridoma cell growth and antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 55:565-570
- Steinmeyer DE, McCormick EL (2008) The art of antibody process development. *Drug Discovery Today*, 13:613-618

- Stojkovic M, Westesen K, Zakhartchenko V et al (1999) Coenzyme Q<sub>10</sub> in submicron-sized dispersion improves development, hatching, cell proliferation, and adenosine triphosphate content of in vitro-produced bovine embryos. *Biol Reprod*, 61:541-547
- Sun IL, Sun EE, Crane FL (1992) Stimulation of serum-free cell proliferation by Coenzyme Q. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 189:8-13
- Sun IL, Sun EE, Crane FL (1995) Comparison of growth stimulation of HeLa cells, HL-60 cells, and mouse fibroblasts by coenzyme Q<sub>10</sub>. *Protoplasma*, 184:214-219
- Sun Z, Zhou R, Liang S et al (2004) Hyperosmotic stress in murine hybridoma cells: effects on antibody transcription, translation, posttranslational processing, and the cell cycle. *Biotechnology Progress*, 20:576-589
- Sunamoto J, Iwamoto K (1988) リポソームの調製. 南江堂:21-40
- Takagi M, Moriyama T, Yoshida T (2001) Effects of shifts up and down in osmotic pressure on production of tissue plasminogen activator by Chinese hamster ovary cells in suspension. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91:509-514
- Takenouchi S, Sugahara T (2003) Lactate dehydrogenase enhances immunoglobulin production by human hybridoma and human peripheral blood lymphocytes. *Cytotechnology*, 42:133-143
- Takeshi Omasa, Mutsumi Takagi, Yoshio Katakura et al (2003) 糖鎖修飾制御法. 特願 2003-293314 号
- Terada S, Nishimura T, Sasaki M et al (2002) Sericin, a protein derived from silkworms, accelerates the proliferation of several mammalian cell lines including a hybridoma. *Cytotechnology*, 40:3-12
- Tsao Y-S, Condon R, Schaefer E et al (2001) Development and improvement of a serum-free suspension process for the production of recombinant adenoviral vectors using HEK293 cells. *Cytotechnology*, 37:189-198
- Turunen M, Olsson J, Dallner G (2004) Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1660:171-199
- Urlaub G CA, Chasin LA. (1985) Efficient cloning of single-copy genes using specialized cosmid vectors: isolation of mutant dihydrofolate reductase genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Feb;82:1189-1193

- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F et al (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, research0034:1 – 11
- Varma A (2003) Enhanced antibody production yields from NS0 cells. Water side conference
- Walsh G (2006) Biopharmaceutical benchmarks 2006. *Nat Biotech*, 24:769–776
- Werner RG (2004) Economic aspects of commercial manufacture of biopharmaceuticals. *Journal of Biotechnology*, 113:171–182
- Wu M-H, Dimopoulos G, Mantalaris A et al (2004) The effect of hyperosmotic pressure on antibody production and gene expression in the GS-NS0 cell line. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 40:41–46
- Wurm FM (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 22:1393–1398
- Yamane-Ohnuki N, Kinoshita S, Inoue-Urakubo M et al (2004) Establishment of *FUT8* knockout Chinese hamster ovary cells: An ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnology and Bioengineering*, 87:614–622
- Yang M, Butler M (2000) Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation. *Biotechnology and Bioengineering*, 68:370–380
- Yann Echelard CAZ, Harry M. Meade (2006) Production of recombinant therapeutic proteins in the milk of transgenic animals. *BioPharm International*, August:34–36
- Yegorov Y, Moldaver M, Vishnyakova K et al (2007) Enhanced control of proliferation in telomerized cells. *Russian Journal of Developmental Biology*, 38:76–89
- Yin J, Li G, Ren X et al (2007) Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, 127:335–347
- Yoshisue H, Suzuki K, Kawabata A et al (2002) Large scale isolation of non-uniform shear stress-responsive genes from cultured human endothelial cells through the preparation of a subtracted cDNA library. *Atherosclerosis*, 162:323–334
- Zanghi JA, Schmelzer AE, Mendoza TP et al (1999) Bicarbonate concentration and osmolality are key determinants in the inhibition of CHO cell polysialylation under elevated pCO<sub>2</sub> or pH. *Biotechnology and Bioengineering*, 65:182–191

- Zhang X, Garcia I, Baldi L et al (2010) Hyperosmolarity enhances transient recombinant protein yield in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology Letters*, 32:1587-1592
- Zhao L, Fan L, Wang J et al (2009) Responses of GS-NS0 Myeloma cells to osmolality: Cell growth, intracellular mass metabolism, energy metabolism, and antibody production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14:625-632
- Zhou Q, Shankara S, Roy A et al (2008) Development of a simple and rapid method for producing non-fucosylated oligomannose containing antibodies with increased effector function. *Biotechnology and Bioengineering*, 99:652-665
- Zhu MM, Goyal A, Rank DL et al (2005) Effects of elevated pCO<sub>2</sub> and osmolality on growth of CHO cells and production of antibody-fusion protein B1: a case study. *Biotechnology Progress*, 21:70-77
- 大柳善彦 (2001) 活性酸素と老化制御. 共立出版株式会社
- 鈴木 誠 (2005) TRPV4 チャネルと機械刺激受容. *生物物理*, 45:268-271

[完]