

トレハロースを用いた CHO 細胞培養における

抗体の凝集抑制

龍澤 実季¹・鬼塚 正義²・白井 昭博²・間世田 英明²・大政 健史²

¹ 徳島大学大学院先端技術科学教育部 環境創生工学専攻

² 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部 ライフシステム部門

〒770-8506 徳島県徳島市南常三島町 2-1

E-mail: omasa@bio.tokushima-u.ac.jp

Home Page: <http://www.bio.tokushima-u.ac.jp/A3/>

抗体医薬品の需要は近年急速に拡大しており、高品質・大量生産を迅速に達成するバイオプロセス構築が望まれている。抗体凝集は品質を左右する重要な要素であり、製造プロセスで生じる抗体凝集問題を解決するバイオプロセス構築は重要な課題となっている。我々はトレハロースの抗凝集作用に着目し、細胞培養プロセスに適用する事で抗体凝集抑制効果を検討した。トレハロース含有培地を用いて抗体産生 Chinese hamster ovary (CHO)細胞株を培養した結果、トレハロースは培養プロセスで生じる高分子量凝集体の形成を効果的に抑制する事が示された。また、抗体生産性向上にも効果が期待できる事が示唆された。

1. はじめに

近年抗体医薬品市場は急速に拡大しており、安価かつ安全性の高い高品質な抗体医薬品生産のバイオプロセス構築は、社会的ニーズであると言える。品質を左右する要素の1つとして抗体の凝集形成が挙げられる。抗体の凝集形成は生産量の減少・薬効の喪失に繋がる。また、より深刻な問題として、凝集抗体の投与に伴う副作用としての免疫反応が挙げられる。バイオプロセスにおける抗体・バイオ医薬品の凝集形成の問題はCromwellらにより2006年に包括的に取り上げられ、抗体生産細胞の培養、抗体精製、保存・製剤化といった各製造プロセスにおいて、凝集抑制・凝集体除去に関する様々なアプローチが試みられている[1,2]。

現在、抗体医薬品の多くは Chinese hamster ovary (CHO)細胞を宿主として生産されており、CHO細胞に基づいた生産系構築は重要である[3]。先述の様に製造プロセスでの凝集形成の抑制は重要な課題であるが、こと抗体生産細胞の培養プロセスにおける抑制に関しては有効な方法が確立されていない。培地中に分泌された抗体は培養温度・pHなどがストレス要因となり凝集を引き起こすが、これらの条件は細胞培養（物質生産）を優先してコントロールされている。従って細胞培養プロセスにおける凝集問題に取り組むには、凝集抑制効果を抗体産生 CHO 細胞の培養条件と両立させ

る必要がある。

トレハロースは蛋白質安定化剤・凝集抑制剤として実績がある“ケミカルシャペロン”であり、他の糖類に比べ高い効果を有する。更にトレハロースは自然界に広く分布し種々の生物が体内に有している。すなわち、CHO細胞培養に対して適用出来る可能性がある。

本研究では我々はトレハロースの抗凝集作用に着目し細胞培養プロセスに適用する事で、抗体に対する凝集抑制効果を検討した。対象とした抗体は、一本鎖二重特異性抗体 (Bispecific single chain diabody-Fc : scDb-Fc) である。scDb-Fcは2種類の抗原認識部位を有する為、高機能な多価性抗体であり、次世代型抗体医薬品として大きな期待が寄せられている[4,5]。一方、我々の結果では、凝集性が高いという問題も有しており、凝集抑制を考慮した生産プロセスの構築が求められている。

2. 解析データおよび方法

(1) トレハロース含有培地による CHO 細胞培養

抗体産生 CHO 細胞株を無血清培地にて培養し、段階的にトレハロース濃度を上昇させ複数回の継代を行う事で、150 mM トレハロース馴化 CHO 細胞株を構築した。構築株を用いて培養プロセスに与える影響を解析

した。また、培養上清から精製した抗体を各種物性評価に用いた。

3. 結果と考察

(1) トレハロースが培養プロセスに与える影響

トレハロース馴化株に対し細胞の比増殖速度を算出した結果、比増殖速度及び最終到達細胞濃度が減少した。トレハロース添加により培地浸透圧が高くなり(480 mOsm/kg)増殖能が低下したと考えられる。またグルコース比消費速度及び乳酸比生産速度に大きな違いは見られず、代謝レベルには影響を与えないと推測される。一方で、トレハロース添加により単位細胞当たりの抗体比生産速度が上昇しており、Real-time PCR の結果、scDb-Fc の mRNA 量が大きく増加している事が明らかとなった。以上の結果から、トレハロースは CHO 細胞の増殖を抑制する一方で、転写量の増加に伴う生産性の向上にも有効である事が示唆された。

(2) 細胞培養プロセスにおける凝集抑制効果

抗体産生 CHO 細胞株及び 150 mM トレハロース馴化株に対し、培養培地中における抗体の凝集性をゲルろ過クロマトグラフィーで分析した結果、トレハロース存在下の培養では高分子量凝集体 (Large Aggregates: LA) の形成が大きく抑制されていた(Fig. 1)。また、円二色性スペクトル測定を行った結果、抗体の Monomer 及び Dimer は類似した抗体様β-ストランドを有する二次構造を示したが、LA は大きく異なる非天然型β-ストランド構造であった。従って、Monomer から Dimer、そして LA という凝集体形成機構において、トレハロースは LA に転移する高次の構造変化を抑制する事で、凝集抑制効果を有すると推察された(Fig. 2)。

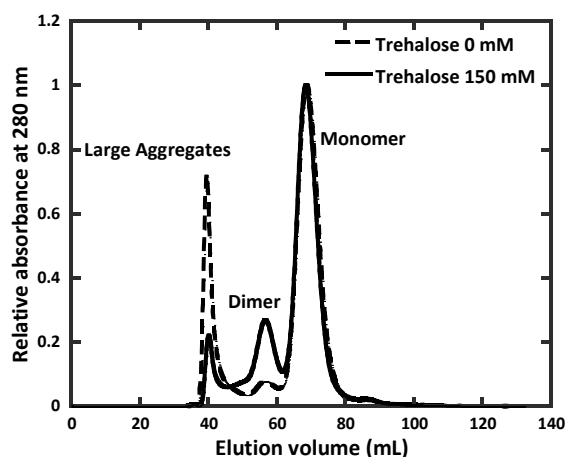


Fig. 1 細胞培養過程における抗体凝集抑制作用

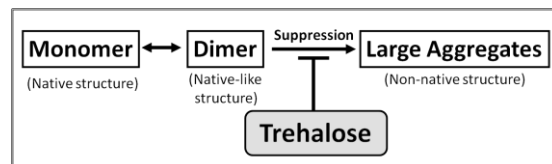


Fig. 2 トレハロースによる凝集抑制メカニズム

4. 今後の展望

本研究は、①抗体産生 CHO 細胞株をトレハロース存在下で培養可能である ②培養過程で生じる Large Aggregates の形成を大きく抑制できる ③トレハロース存在下による培養は抗体生産性の向上にも効果が期待できる 事を示した。以上の結果及び培地への添加という簡便さから、トレハロースは凝集抑制を目的としたバイオプロセス構築に有効な手段であると提案する。

高品質な抗体医薬品を製造する為には、生産細胞の構築から製剤化までのプロセスを包括的に最適化する必要がある[3]。トレハロースは現在バイオ医薬品の保護剤として製剤化・長期保存時に用いられているが、本研究は細胞培養過程の凝集抑制にも有効である事を示した。今後、精製過程にも適用する予定であり、細胞培養・抗体精製・長期保存を介したバイオ医薬品製造の全過程を通して使用できる抗凝集剤としての可能性を検討していきたい。

参考文献

- [1] ME Cromwell, *et al.*: AAPS J., Vol.8 No.3, E572-579 (2006)
- [2] M Vazquez-Rey, DA Lang: Biotechnol. Bioeng., Vol.108 No.7, 1494-1508 (2011)
- [3] T Omasa, *et al.*: Curr. Pharm. Biotechnol., Vol.11 No.3, 233-240 (2010)
- [4] R Asano, *et al.*: J. Biol. Chem., Vol.282 No.38, 27859-27665 (2007)
- [5] M Onitsuka, *et al.*: Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.94 No.1, 69-80 (2012)