CystineとTyrosine添加による CHO細胞の抗体生産性の向上

Improvement of Antibody Production in CHO Cells by Addition of Cystine and Tyrosine

柴藤 祐介* Yusuke Shibafuji

Chinese hamster ovary (CHO) 細胞による抗体生産プロセス開発において、アミノ酸濃度の適切な コントロールは重要なポイントとなる。高濃度で細胞毒性を示すCysteine (Cys) や溶解度の低い Tyrosine (Tyr) のようなアミノ酸を培養期間中に厳密に制御することは容易ではなく、CysやTyrの 添加に関連する小胞体 (ER) ストレスや酸化ストレスといった阻害要因の細胞内メカニズムを理解し たうえで、プロセスパラメーターを最適化する必要がある。

本研究では、Cysより毒性が低く、添加剤としてより一般的に用いられるCystineとTyrの添加が細胞内メカニズムに与える影響を解明するため、マルチオミクス解析(トランスクリプトーム及びプロテオーム)を実施した。その結果、Cystineの添加は、ERストレスとER関連分解(ERAD)およびアポトーシスの促進により、生存率と生産性の低下をもたらすことが明らかとなった。一方、Tyrの添加はERストレスとアポトーシスを抑制することが確認され、この作用は、Tyrから生合成されるユビキノン(コエンザイムQ10)に起因することが示唆された。Cystine添加によってもたらされるアポトーシス促進効果を抑制するため、TyrとCystineを同時に添加したところ、GSH代謝の活性化、ERストレスと酸化ストレスの抑制、ERADの減少、クエン酸回路(TCA cycle)の活性化などの変化が確認され、細胞の増殖、生存率が向上し、抗体生産性が向上した。また、パスウェイ解析の結果から、DNA修復の安定化、細胞分裂の促進、酸化的リン酸化の活性化に関連する経路が、抗体産生に重要であることが示唆された。本研究で示されたマルチオミクスアプローチは、動物細胞に限らず、多様な細胞への応用も期待され、将来のモダリティも含めた多様なバイオプロセスの改善につながると考えられる。

Improvement of Antibody Production in CHO Cells by the Addition of Cystine and Tyrosine

For the monoclonal antibody (mAb) production process, controlling the concentration of amino acids is important. In particular, cysteine (Cys) and tyrosine (Tyr) are difficult to control in a culture process because of toxicity and low solubility. To achieve high productivity, the intracellular mechanisms of inhibitory events, such as endoplasmic reticulum (ER) stress and oxidative stress related to Cys and Tyr, need to be considerably elucidated. In this study, we performed multi-omics analyses (transcriptome and proteome) to compare the conditions of adding Tyr and cystine, a precursor of Cys with less cytotoxicity. The addition of cystine resulted in decreased viability and productivity because of increased ER stress, the promotion of ER-associated degradation (ERAD) and apoptosis. Conversely, the addition of Tyr suppressed ER stress and apoptosis. We thought that this effect was due to the increase in the quantity of ubiquinone (Coenzyme Q10) biosynthesized from Tyr. To inhibit the apoptosis caused by the addition of cystine, Tyr was added simultaneously with cystine. These conditions improved growth, viability, and mAb productivity because of the activation of glutathione metabolism, suppression of ER stress and oxidative stress, reduction of ERAD, and activation of the tricarboxylic acid cycle. The results of ingenuity pathway analysis suggest that pathways related to DNA repair stabilization, cell division promotion, and oxidative phosphorylation activation are important for mAb production. The multi-omics approach presented in this study will lead to improve bioprocess.

^{*}AGC株式会社 先端基盤研究所(yusuke.shibafuji@agc.com)

1. 緒言

近年、バイオ医薬品が注目を集めており、特に標的 分子への高い特異性から抗体医薬品の開発が活発に行 われている⁽¹⁾。抗体生産の需要拡大に伴い、多くの 企業は生産プロセスの改良に注力している。抗体生産 には、一般的にCHO細胞が利用されることが多く、 培養培地や培養方法の最適化により、必須栄養素の枯 渇を防ぎつつ、乳酸やアンモニアの蓄積を防ぐような プロセスデザインがなされてきた⁽²⁾。これらの研究 のほとんどは、1つの要因の効果に焦点を当てており、 アミノ酸等の必須成分の交互作用に関する研究はまだ 限られている。また、より高い生産性を達成するため には、細胞のERストレスや酸化ストレス等の阻害要 因として知られる細胞内メカニズムの解明が必要であ るが、その研究はまだ不十分である。

CHO細胞による抗体生産において、重要アミノ酸 濃度の厳密な制御が、高い抗体生産性を達成するため に必須であることが認識されている。しかし、細胞毒 性を示すCysteine (Cys) や溶解度の低いTyrosine (Tyr)のようなアミノ酸の制御は添加溶液調整の難 しさや濃度コントロールがシビアであることから課題 が多い⁽³⁴⁾。

Cysは必須アミノ酸ではないが、細胞にとって必要 不可欠であり、増殖や生存率の維持・生産性の向上に 影響を与えるとの報告がこれまでに多数なされている ^(3,5)。しかし、pKaが8.45であるCysのチオールは生理 的条件下 (pH 7.4)で比較的容易に解離し、チオラー トアニオンを生じるため、細胞毒性が強く、培地中の Cys濃度は低く抑えられていることが一般的である ⁽⁶⁾。一方で、Cystineはチオール基がジスルフィド結 合を形成しているため解離が生じない。また、 Cystine/glutamate transporterにより容易に細胞内 に輸送されるため⁽⁷⁾、細胞にとって安全なCys源と なる。

Cysはグルタチオン (GSH) 合成の律速基質であり、 Cysの枯渇は細胞内GSHの枯渇を引き起こす。GSHは トリペプチド (y-L-グルタミル-L-システイニルグリ シン)であり、活性酸素の解毒や小胞体でのジスルフ ィド結合形成の調節等、細胞内のERストレスや酸化 ストレスの軽減作用と密接に関係している⁽⁸⁻¹⁰⁾。

抗体には多数のジスルフィド結合が存在するため、 この結合の形成が抗体生産の律速となる。ジスルフィ ド結合の形成には、Protein disulfide isomerase (PDI)が必要であり、PDIは新生ポリペプチド鎖の Cysと電子を授受し、酸化的フォールディングを触媒 する。この過程で還元されたPDIは再酸化され、過酸 化水素(H₂O₂)を発生させる。発生したH₂O₂はGSH により還元される。このため、GSHはH₂O₂の解毒に 重要であり、GSHの枯渇は、酸化ストレスによるER ストレスを誘導する^(3.5.11)。このため、細胞内のCys 濃度の低下は、GSHに関連した細胞ストレスを惹起 し、抗体の生産性の減少を引き起こすと考えられてい るが⁽¹²⁾、そのメカニズムの詳細はまだ十分にわかっ ていない。

Tyrは比生産性(Qp)の維持とTyr配列変異の回避 に関与することがわかっており、培養時のTyr濃度の 減少は、生細胞密度(VCD)の減少や、生存率の下落 を引き起こす^(13,14)。Tyr濃度の低下が、オートファ ジー性細胞死によるリソソームの酸性化と細胞溶解を 生じさせる可能性が示唆されているが⁽⁴⁾、Tyrの枯渇 によって生じる細胞ストレスや培養トレンドの変化と の関連・詳細メカニズムについては、未だ明らかとな っていない。また、ベンゾキノンのキノイド核である コエンザイムQ10は、細菌や真核微生物のシキミテー ト経路に由来し、哺乳類では必須アミノ酸であるTyr から合成され、酸化ストレス軽減作用があることがわ かっている⁽¹⁵⁾。ただし、このようなTyr由来の生合 成由来分子の細胞への影響の詳細はわかっていない。

本研究では、マルチオミクス解析により、Cystine とTyr添加に伴うERストレス、酸化ストレス、TCA サイクル活性、オートファジー、アポトーシスに関連 する抗体産生阻害因子を特定し、CystineとTyrの細 胞への影響を明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

2.1. オミクス解析のためのFed-Batch培養

無血清振とう培養に適応させたDG44 CHO細胞を ホスト細胞として、IgGをGOI (Gene of interest) と した抗体発現用ベクター (自社開発)を細胞にトラン スフェクションした。得られたトランスフェクタント プールをシングルセルクローニングし、クローンを取 得した。取得してきた抗体生産クローンを用いて、 Fed-batch培養を行い、オミクス解析のためのサンプ リングを実施した。

Fed-batch培養は、シェーカーインキュベーターに て、125 mLエルレンマイヤーフラスコを用いて実施 した。培養は、37.0 °C、125 rpm (振とう直径25 mm)、5 % CO₂条件で行った。独自の化学的に定義 された基礎培地を使用し、開始容量 30 mLで各条件 それぞれ3回の培養を実施した (Three biological replicates)。生細胞密度 0.5 x 10⁶ cells/mLでFedbatch培養を開始し、独自の化学的に定義されたFeed 培地を一定の間隔で添加した。CystineとTyrのスト ック溶液をそれぞれ調整し、Feed培地と同様に培養3

Table 1 Fed-Batch culture condition list

Fed-Batch culture conditions								
Condition	Amount of Cystine to be added in one feed		Amount of Tyrosin to be added in one feed					
	Ratio	Addition amount [µmol]	Ratio	Addition amount [µmol]				
C:T = 0:0	0.0	0.0	0.0	0.0				
C: T = 1: 0	1.0	3.7	0.0	0.0				
C:T = 0:3	0.0	0.0	3.2	11.9				
C: T = 1:3	1.0	3.7	3.2	11.9				
C:T = 3:3	3.0	11.1	3.2	11.9				

参考文献 ⁽¹⁶⁾ より改変転載

日目から添加した。各培養条件のCystine、Tyrは標 準添加量を1.0とした時の比率として**Table 1**に示す量 を添加した。

2.2. コエンザイムQ10を添加したBatch培養

前述と同じIgG発現クローンを用いてBatch培養を 行った。125 mLエルレンマイヤーフラスコを用いて、 シェーカーインキュベーターにて培養を行った。CD DG44 medium (Thermo fisher : Catalog number: 12610010) に、L-Glutamine、Insulin、Pluronicを添 加した培地を基礎培地として使用した。培養の開始液 量を25 mLとし、各培養条件でそれぞれ3回の培養を 実施した (Three biological replicates)。Batch培養 開始時 (Day 0) に、**Table 2**に示した量のサプリメン トを添加し、培養Day 7にサンプリングを行った。

Table 2 Batch culture condition list

Batch culture conditions						
Condition name	Solvent type	Final concentration				
Control -		-				
Tyr	Water	0.80 mM				
Ethanol	Ethanol	1.0 % Ethanol (v/v)				
Coenzyme Q10	Ethanol	0.012 nM in 1.0 % Ethanol (v/v)				

参考文献 (16) より改変転載

2.3. 生細胞密度、生存率、生産性および 代謝物の測定

VCDと生存率の測定は、Vi-CELL XR Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter)を用いて、トリパン ブルー排除法により測定した。生産性の測定は、培養 液を遠心分離 (9391 g x 1 min, 4 $^{\circ}$) して細胞を除 去し、Octet (Sartorius)を用いて測定した。また、 代 謝 物 の 測 定 は BioProfile FLEX2 (Nava biomedical)を用いて実施した。

2.4. トランスクリプトームとプロテオーム

各培養条件から、3回のサンプリングを実施した。 サンプリングした培養液を遠心(14000 g x 30 sec x 2°C)によって細胞と上清に分離し、上清を除去し た。残った細胞ペレットを2 mLの氷冷したPBSで洗 浄した後、再び遠心分離(14000 g x 30 sec x 2°C) してPBSを除去し、得られた細胞ペレットサンプルを 分析するまで-80 ℃で凍結保管した。

トランスクリプトームのシーケンシングはAzenta Life Sciences (Chelmsford, MA, United States) にて行った。細胞ペレットから全RNAを抽出し、 polyA選択によってmRNAを濃縮した。mRNAをも とにライブラリーを調製し、イルミナ社NGSによっ てペアエンドモードでシーケンシングを行った。

RNA-seqのデータはFastp version 0.21.0⁽¹⁷⁾ によ ってトリミングした後、STAR version 2.7.6a⁽¹⁸⁾ を 用いてゲノムDNA配列 (Cricetulus griseus CHOK1GS, Ensembl release 104, accession number GCA_900186095.1)にアライメントした。アライメ ント結果をもとにRSEM version 1.3.3⁽¹⁹⁾ を用いて転 写産物のカウントを行った。発現変動遺伝子の検出は edgeR version 3.38.1⁽²⁰⁾ を用いて行った。

プロテオーム測定はThermo Scientific EASYnLC1200 (Thermo Fisher Scientific) および Thermo Scientific Orbitrap Eclipse Tribrid mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific)を用いて 行った。

LC/MSによって取得したデータはScaffold DIA version 3.1.0 (Proteome Software, Oregon, United States)を用いて解析した。スペクトルライブラリー はEnsemblから取得したアミノ酸配列 (C. griseus CHOK1GS, Ensembl release 104)をもとに、 Scaffold DIAとProsit⁽²¹⁾を用いて作成した。

パスウェイ解析はIngenuity Pathway Analysis software (IPA, QIAGEN)を用いて行った。

3. 実験結果

3.1. Cystine添加の影響

(C:T=1:0とC:T=0:0の比較)

Cystineの添加条件(C:T=1:0)と無添加条件 (C:T=0:0)の比較を行うためにFed-Batch培養および オミクス解析を行った。Cystine添加有無の培養トレ ンドデータおよびオミクス解析の結果を**Fig.1**に示す。

先行研究とは異なり^(3,5)、Cystineの添加により、 培養後半に生存率および生産性が低下する傾向が確認 された。C:T=1:0条件では、Day14まで生存率が維持 できず、オミクス解析のための適切な細胞サンプルを 取得できなかったため、C:T=1:0条件に関してはDay 12までのオミクスデータをC:T=0:0条件と比較した。

Hspa5(Bip, GRP-78)および*Ern1*はERストレス のマーカーであることが知られている^(22,23)。また、 活性化転写因子3遺伝子(*Att3*)はERストレスによる PERKの活性化により発現が誘導されることが知られ ている⁽²⁴⁾。これらのERストレスマーカーのmRNA 量がCystineの添加により、顕著に増加していること から、Cystineの添加がERストレスの原因となってい ることが示された(**Fig. 1 D, E, F**)。

ERAD関連因子として知られている活性化転写因 子6遺伝子 (Att6)、UBX domain-containing protein 4 (Ubxn4)、Suppressor/Enhancer of Lin-12-like (Sel11)のmRNAレベルを比較した(Fig. 1 G, H, I)。 Att6は小胞体ストレス応答(UPR)に関連し、ERAD 経路の構成要素であることが知られている⁽²⁵⁾。 Ubxn4はUBXD2とも呼ばれ、Ubxn4 geneにコード されるタンパク質であり、ERADを促進するER内在 性膜タンパク質であることがわかっている⁽²⁶⁾。また、 Sel11は、ERADにおいて、ミスフォールドした小胞 体タンパク質のユビキチン依存性分解に関与している ことが報告されている⁽²⁷⁾。C:T=0:0条件に比べて C:T=1:0条件で、これらマーカーのmRNA量が顕著に 増加していた。この結果から、Cystineの添加によっ て培養後半に積極的なERADが引き起こされること が明らかとなった。

また、アポトーシスに関連する因子の培養条件間の 比較を行った。ERストレスによりアップレギュレー ションされるアポトーシス誘導タンパク質GADD34 (*Ppp1r15a*)は、プロテアソーム阻害による細胞死を 促進することがわかっている⁽²⁸⁾。この*Ppp1r15a*の mRNA量が、C:T=1:0条件で顕著に上昇していること から、Cystine添加条件では、有意にアポトーシスが 促進されていることが確認された(**Fig. 1J**)。

3.2. Tyrosine添加の影響

(C:T=0:3とC:T=0:0の比較)

先行研究では⁽⁴⁾、CHO細胞のFed-batch培養中、 Tyrの添加によって、培養後半の生存率の減少抑制 や、オートファジー性細胞死の抑制ができることが報 告されている。Tyr添加が培養に与える影響について 検証するため、Fed-batch培養とオミクス解析を行っ た(Fig. 2)。

培養結果から、先行研究と同様に、Tyrの添加は、 生存率の減少を抑制できることがわかった。また、 ERストレスのマーカーである*Hspa5, Ern1, Atf3*の mRNA量が減少していることから、Tyrの添加によ ってERストレスを抑制できることが確認できた (**Fig. 2 D, E, F**)。

先行研究で示唆されている、Tvr添加によるオート ファジー抑制効果の検証として、C:T=0:0条件と C:T=0:3条件におけるP62/Sqstm1の発現量を比較し た。P62/Sqstm1はLC3と直接結合することで選択的 にオートファゴソームに取り込まれ、オートファジー によって効率的に分解されることがわかっている。そ のため、オートファジーが阻害されると蓄積し、オー トファジーが誘導されると減少する⁽²⁹⁾。Fig. 2Gの 結果から、P62/Sqstm1のmRNA発現量をTyr添加条 件(C:T=0:3)とTyr無添加条件(C:T=0:0)間で比較 したところ、ほぼ同程度であることがわかった。この 結果は、Tyr添加の有無によってオートファジーの頻 度に差が無いことを示している。一方、Ppp1r15aの mRNA発現量がTyr添加条件(C:T=0:3)で減少して いることから、Tyr添加によるアポトーシスの抑制は 確認された (Fig. 2H)。

Tyr添加によるアポトーシスの抑制・生存率の維持 作用がどのようなメカニズムで生じているかを検証す るため、Tyrから生合成されるコエンザイムQ10に着 目した。コエンザイムQ10が酸化ストレスを軽減さ せ、アポトーシスを抑制している可能性を検証するた め、Tyr無添加のBatch培養中にコエンザイムQ10を 添加し、Tyr添加の条件と同様の結果が得られるかを 検証した(Fig. 2 I, J)。結果、コエンザイムQ10の添 加は、Tyr添加と同レベルの生産性をもたらすことが 確認され、Tyr添加条件よりも生存率の低下を防げる ことがわかった。この結果は、Tyrから生合成される コエンザイムQ10が培養後半の生存率の維持、具体的 には、酸化ストレスの減少やアポトーシスの抑制に効 果があるという仮説を支持するものと思われる。

3.3. Cystine とTyrosineの同時添加の影響 (C:T=0:3、C:T=1:3、C:T=3:3の比較)

Cystine添加による還元力低下から生じるアポトー シスを抑制しつつ、十分量のCysを細胞に供給するた め、Cystineと同時にTyrを添加し、Cystineの量比を 変えた実験を行った。また同時に、CystineとTyrの 相乗効果を明らかにするため、トランスクリプトーム とプロテオーム解析を実施した(Fig. 3 - 4)。

Cystineのみ添加した条件(C:T=1:0条件, **Fig. 1**)と は異なり、十分なTyrを同時添加することで



Fig. 1 The effect of Cys addition in fed-batch culture. (A) VCD profile, (B) Viability profile, (C) Titer profile, (D) – (J) Time-course plots of the associated RNA transcripts (CPM). Each value represents the mean value (N=3), and error bars represent the standard deviation. Gray (circle dots) and green (triangle dots) indicate C:T=0:0 and C:T=1:0 conditions, respectively.

参考文献 (16) より改変転載

(C:T=1:3, C:T=3:3)、増殖能が向上し、生存率が高く 維持され、生産性が向上することがわかった(Fig. 3 A, B, C)。最終的な生産性はC:T=0:3条件の生産性を 基準として、C:T=1:3条件では約2倍、C:T=3:3条件で は約3倍も生産性が向上した。C:T=3:3条件は、 C:T=1:3条件と比べて、増殖も大幅に改善されてい る。これらの結果から、CHO細胞のCystineの消費に はTyrが必要であることが示唆された。

また、ERストレスマーカーであるHspa5, Ern1,



Fig. 2 The effect of Tyr addition in fed-batch culture. (A) VCD profile, (B) Viability profile, (C) Titer profile, (D) – (H) Time-course plots of the associated RNA transcripts (CPM). Each value represents the mean value (N = 3), and error bars represent the standard deviation. Gray (circle dots) and blue (square dots) indicate C:T=0:0 condition and C:T=0:3 conditions, respectively. (I) and (J) Viability and productivity data with coenzyme Q10 addition. Each value represents the mean value (N=3), and error bars represent the standard deviation (* : P value <0.0274,**** : P value <0.0001).</p>

参考文献 (16) より改変転載

*Att3*の結果より(**Fig. 3 D, E, F**)、C:T=0:3条件と比 べて、C:T=1:3条件とC:T=3:3条件で、ERストレスマ ーカーのmRNA量が培養後半に低い。このことから、 CystineとTyrの十分量の添加は、ERストレスを抑え る効果があることがわかった。

抗体はジスルフィド結合が多く、複雑な立体構造を したタンパク質であり、その生産にはPDI等の分子シ ャペロンが欠かせない。Fig. 3 G, Hの結果から、PDI の発現量がCystineとTyrを必要量添加することで上



Fig. 3 The synergistic effects of cystine and Tyr in fedbatch culture. (A) VCD profile, (B) Viability profile, (C) Titer profile, (D) – (J) Time-course plots of the associated RNA transcripts (CPM) and proteins (abundance). Each value represents the mean value (N=3), and error bars represent the standard deviation. Blue (square dots), orange (inverted triangular dots), and red (diamond dots) indicate the C:T=0:3, C:T=1:3 and C:T=3:3 conditions, respectively.

参考文献 ⁽¹⁶⁾より改変転載

昇することがわかった。この結果から、細胞内で分子 シャペロンが適切にワークし、タンパク質の適切なフ ォールディングがなされることによって、ミスフォー ルディングタンパク質の滞留によるUPRを防ぎ、抗 体の生産性を向上できていると考えられる。

Superoxide dismutase 1 and 2 (SOD1, SOD2) は、それぞれ細胞質およびミトコンドリアでスーパー オキシドアニオンラジカルをより害の少ないH₂O₂に 変換する酵素であり、酸化ストレスおよび細胞毒性か



Fig. 4 The effects of cystine and Tyr. (A) – (J) Time-course plots of the associated RNA transcripts (CPM) and proteins (abundance). Each value represents the mean value (N=3), and error bars represent the standard deviation. Blue (square dots), orange (inverted triangular dots), and red (diamond dots) indicate the C:T=0:3, C:T=1:3 and C:T=3:3 conditions, respectively. 参考文献 ^(T6) より改変転載

ら細胞を保護するのに役立つことが分かっている^(30,31)。SOD1, SOD2のタンパク質発現量は、C:T=0:3 条件に比べて、C:T=1:3条件とC:T=3:3条件にて増加 している(Fig. 3 I, J)。この結果から、C:T=1:3条件 とC:T=3:3条件では、酸化ストレスに適切に対処でき ていることがわかった。適切なシャペロンの発現と、 それに伴う酸化ストレスへの対処が豊富なCysから生 じるGSHおよびSODにより達成できている可能性が 考えられた。

次に、GSH代謝関連因子の比較を行った(Fig. 4 A, **B**, **C**)。GSH代謝に関連する酵素として、膜外酵素 y-グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) とグルタチオ ンS-トランスフェラーゼ (GST) がある。GGTは、細 胞外 GSH のグルタミン酸とCysの間の y-グルタミ ル結合の加水分解を触媒し、GSHの分解を促進させ る酵素である⁽³²⁾。GSTMは、μファミリーに分類さ れるGSTであり、GSHと求電子分子との結合を触媒 することで、細胞内の解毒を行うことがわかっている ⁽³³⁾。Fig. 4の結果から、C:T=0:3条件でGgt1のmRNA 発現量が増加していることがわかった。この結果か ら、Cysの供給がないC:T=0:3条件においては、細胞 内にCysを取り込むために、GSHを積極的に分解して いることが示唆された。一方で、C:T=1:3条件と C:T=3:3条件では、細胞内Cys量が十分であるため、 Ggt1の発現量が抑えられ、GSHの分解が抑制されて いることがわかった。また、Gstm2, Gstm7のmRNA 量が、C:T=0:3条件と比較して、C:T=1:3条件と C:T=3:3条件で多くなっていることから、C:T=1:3条 件とC:T=3:3条件では細胞内の解毒作用が活性化され ていることがわかった。これらの結果から、C:T=1:3 とC:T=3:3の条件では、分解されずに残ったGSHを H₂O₂の還元や細胞の解毒に利用することができ、細 胞活動をより正常化および活性化することができてい ると考えられた。

抗体の生産性に影響を与えるERAD関連因子の比 較を行うため、前出しているAtt6, Ubxn4, Sel11の mRNA量を解析した(Fig. 4 D, E, F)。これらの因子 の発現量がC:T=0:3条件で顕著に多く、Att6とSel11 に関してはC:T=1:3条件とC:T=3:3条件の結果で見ら れるようにCystineの添加量を多くすることに伴っ て、ERAD関連因子の発現量が減少することがわか った。この結果から、TyrとCystineの十分量の添加 は、ERストレス・酸化ストレスを抑制し、ERADを 抑えることができることがわかった。

最後に、細胞の増殖や生存率に影響を与えるTCA 回路関連因子とアポトーシス関連因子の比較解析を行 った(Fig. 4 G, H, I, J)。TCA回路活性化のための重 要な酵素として、コハク酸デヒドロゲナーゼ(SDH) およびアコニターゼ(ACO)がある。SDHは、クエ ン酸サイクル中で、コハク酸をフマル酸に酸化する機 能があり、SDHA・SDHBはSDHの触媒コアを形成 する2つのサブユニットである⁽³⁴⁾。ACOはTCAサイ クル中でクエン酸をイソクエン酸に変換する酵素であ り、ACO2はミトコンドリアで発現することが知られ ている。ACOの活性は、酸化ストレスのバイオマー カーとしても良く知られており、酸化還元状態のミト コンドリア内センサーとして機能することがわかって いる⁽³⁵⁾。**Fig. 4 G, H, I**のSDHA・SDHBおよびACO2 のタンパク質発現量のデータから、C:T=0:3条件に比 べて、C:T=1:3条件とC:T=3:3条件では、SDHA・ SDHBおよびACO2の培養後半での発現量が高く、培 養後半までTCA回路が活性化できていることが示唆 される。また、アポトーシスマーカーのPpp1r15aの 結果から、C:T=0:3条件と比較して、C:T=1:3条件と C:T=3:3条件では、Ppp1r15aのmRNA量が減少傾向 であることから、C:T=1:3条件とC:T=3:3条件にてア ポトーシスが抑制されていることがわかった。

オミクス解析結果から、C:T=0:3条件と比べて、 C:T=1:3条件とC:T=3:3条件では、細胞内ストレスが 同程度抑制されていることがわかったが、C:T=1:3と C:T=3:3では、増殖・生産性に差がある。この理由を 明らかにするため、全トランスクリプトームデータの 発現変動レベルを解析した(トランスクリプトーム解 析のデータからFDR < 0.05の遺伝子を抽出した)。 Day6, Day9, Day12, Day14において、発現変動が見 られた遺伝子の数をFig. 5にまとめた。この結果か ら、Day 12が最も発現変動遺伝子の数が多く、培養 条件間の細胞内パスウェイの活性化度合いに最も差が あることがわかった。



Fig. 5 Number of genes with variable mRNA expression for each culture day in the C:T=1:3 and C:T=3:3 conditions (genes with FDR < 0.05 were extracted from the transcriptome analysis data).

次に、発現変動遺伝子数が最も多かったDay12のデ ータについて、C:T=1:3条件とC:T=3:3条件の間でど のようなパスウェイがアクティベートされているかを 調べるため、パスウェイ解析を行った。同定された 533のパスウェイの中、C:T=1:3条件に対してC:T=3:3 条件にてz-scoreが高かった上位5つのパスウェイを **Table. 3**にまとめた。 DNAの修復やDNAの複製の安 定化に関連するパスウェイや染色体分離、ATP生産 に関連するパスウェイがC:T=3:3条件でアップレギュ レートされていることが明らかになった。

Table 3 The top five pathways with the highest z-score (-log (p-value) > 1.3) under the C:T=3:3 condition relative to the C:T=1:3 condition.

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	Ratio	z-score
Oxidative Phosphorylation	7.06	0.198	4.69
Cell Cycle Control of Chromosomal Replication	9.45	0.321	4.243
Kinetochore Metaphase Signaling Pathway	16.5	0.306	3.138
NER (Nucleotide Excision Repair, Enhanced Pathway)	4.5	0.165	2.887
BER (Base Excision Repair) Pathway	2.08	0.159	2.646

参考文献 ⁽¹⁶⁾ より改変転載

4. 考察

本研究では、マルチオミクス解析により、Cystine とTyr添加による培養トレンドと細胞内ストレスとの 関係を明らかにした。Cystine単独の添加では、培養 後半に生存率が減少、生産性が低下し、ERストレス がその原因となっていることがわかった。また、細胞 内では、ERADの活性化およびアポトーシスの促進 が確認された。CHOのFed-batch培養における Cystine単独の添加は、細胞内での還元力を不足さ せ、細胞増殖・生産性に悪影響を及ぼすことが示唆さ れた。

一方、Tyr単独の添加は、ERストレス・アポトー シスを抑制する効果があることが確認された。先行研 究より、Tyr添加による生存率の維持は、オートファ ジー性細胞死の抑制効果によるものであるとされてい たが⁽⁴⁾、*P62/Sqstm1*の発現量の結果から、Tyr枯渇 条件での生存率の減少は、オートファジー誘導による 細胞死ではないことが示唆された。

Tyrのアポトーシス抑制効果の検証として、Tyrか ら生合成されるコエンザイムQ10の添加実験を行った ところ、コエンザイムQ10が培養後半の生存率の維持 に効果があることがわかった。つまり、コエンザイム Q10は細胞内ストレスやアポトーシスの抑制に効果が あることが示唆された。ユビキノンは、主にミトコン ドリアで活性があるとの報告がある一方で⁽³⁶⁾、ユビ キノンがゴルジ体やER膜に存在していることを示唆 する報告もあり⁽³⁷⁾、UBIAD1という酵素はミトコン ドリア外にユビキノンを生産する酵素であることが報 告されている⁽³⁸⁾。今後、コエンザイムQ10のより詳 細な効果の検証を行うために、ERでのストレス緩和 のメカニズムの詳細を調べる必要があると考える。

一方、Tyrの単独添加は、生産性に大きな影響を与 えなかった。これは、GSH利用の減少に対応するた め、細胞代謝は、活性酸素の産生を抑えるために組換 えタンパク質の産生を減少させたことに由来すると考 えられる。この制御は、タンパク質のリン酸化等、こ の種のプロテオーム解析では検出されない他の制御機 構に起因する可能性もあると考えられる。

次に、Cystineと同時にTyrを添加し、Cystineの量 比を変えた実験を行ったところ、十分なCystineと Tyrを添加することで、増殖能の向上・生存率の維持・ 生産性の向上を同時に達成できることが明らかとなっ た。ERストレスの抑制とGSH代謝の活性化やSOD1 とSOD2による酸化ストレスへの適切な対処、ERAD の減少およびTCAサイクルの活性化が増殖や生産性 の向上に影響していることがわかった。また、 CystineとTyrの十分量な添加は、PDIの発現をアッ プレギュレートすることがわかった。PDIA4はCHO 細胞における抗体のジスルフィド結合形成を触媒する ことにより抗体生産に影響を与えることが知られてお り⁽³⁹⁾、本研究で確認されたPDIA4の発現量の増加 は、Komatsuらの結果と一致する。

また、C:T=1:3条件とC:T=3:3条件の増殖・生産性 の差を明らかにするためにパスウェイ解析を行った。 C:T=1:3条件に対してC:T=3:3条件にてz-scoreが高か った上位5つのパスウェイのうち3つのパスウェイは、 DNAの修復やDNAの複製の安定化に関連するパスウ ェイであることが確認された。BER (Base Excision Repair) Pathwayは、内因性および外因性の変異原に よって生じるDNA損傷および鎖切断の修復に関連す るパスウェイであり、NER (Nucleotide Excision Repair, Enhanced Pathway) については、局所的な 一本鎖DNA損傷を認識し、その損傷の除去に関連す るパスウェイである。また、Cell Cycle Control of Chromosomal Replicationは、細胞分裂過程で起こる DNA複製を安定化させるパスウェイである。この結 果から、C:T=3:3条件では、細胞はゲノムの安定性を 高める機能を活性化させることで、培養後半の細胞に とって過酷な状況下においても、抗体生産を維持でき る機能が働いていることが示唆された。また、 C:T=3:3条件では、Kinetochore Metaphase Signaling Pathway とOxidative Phosphorylation が 活性化されていることがわかった。Kinetochore Metaphase Signaling Pathwayは、キネトコアと微 小管の相互作用を活性化し、細胞分裂の染色体分離を 行うためのパスウェイであるため、細胞の増殖を促進 する働きに関連していると考えられる。Oxidative Phosphorylationは、電子輸送系における電子の移動 に由来するエネルギーを用いて細胞活動に欠かせない ATPを生産するパスウェイである。ユビキノンは、 ミトコンドリア膜内で電子をNADH-, FAD-dependent enzymesからRespiratory Complex IIIに輸送する役 割がある⁽¹⁵⁾。このことから、**Fig. 2 I, J**で示したコエ ンザイムQ10の添加による効果とOxidative Phosphorylationの活性化について、何らかの関係が ある可能性が考えられるが、検証を行うためには、更 なる研究が必要である。

5. 総括

CystineとTyrの添加が細胞ストレスやアポトーシ スに与える影響をオミクス解析によって明らかするこ とができた。特に本研究では、CystineやTyr単独の 要因による効果ではなく、2つのアミノ酸の交互作用 を含む複雑な細胞メカニズムの詳細を明らかにした。 また、培養条件間の比較により、CHO細胞による抗 体生産には、CystineおよびTyrの供給比率と濃度が 重要であることがわかった。

本研究のマルチオミクス解析で比較検討した各因子 は、バイオプロセス中のストレスをモニタリングする ための潜在的なマーカーになると考えられる。これら のマーカーを指標に培養プロセスの開発を行うこと で、細胞ストレス軽減アプローチを通じてTyrに変わ るコエンザイムQ10のような、代替添加物の可能性を 特定することができると考える。

また、本研究で実施したマルチオミクス解析を活用 した培養プロセス開発のアプローチは、Fed-Batch培 養だけでなく、パーフュージョン培養等の様々な培養 モードにも適用できると考えられ、応用範囲が広いと 考えられる。今後、より複雑化することが予想される 多様なモダリティのバイオ医薬品の生産プロセスを開 発するにあたり、培養プロセス条件の変動に対する細 胞内メカニズムの詳細を理解することが、バイオプロ セスの生産性と堅牢な制御の向上にとって重要である と考える。

謝辞

本論文作成に際し、ご指導・ご鞭撻を賜りました東 京農工大学 養王田 正文 教授に感謝申し上げます。

—参考文献—

- Walsh, Gary. "Biopharmaceutical benchmarks 2018." Nature biotechnology vol. 36, 12 (2018): 1136-1145. doi:10.1038/nbt.4305
- (2) Jeon, Min Kyoung et al. "Combinatorial engineering of ldh-a and bcl-2 for reducing lactate production and improving cell growth in dihydrofolate reductase-deficient Chinese hamster ovary cells." Applied microbiology and biotechnology vol. 92, 4 (2011): 779-90. doi:10.1007/s00253-011-3475-0
- (3) Ali, Amr S et al. "Multi-Omics Study on the Impact of Cysteine Feed Level on Cell Viability and mAb Production in a CHO Bioprocess." Biotechnology journal vol. 14, 4 (2019): e1800352. doi:10.1002/biot.201800352
- (4) Tang, Hongping et al. "Insight into the roles of tyrosine on rCHO cell performance in fed-batch cultures." Applied microbiology and biotechnology vol. 103, 16 (2019): 6483-6494. doi:10.1007/s00253-019-09921-w
- (5) Zeeshan, Hafiz Maher Ali et al. "Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS." International journal of molecular sciences vol. 17, 3 327. 2 Mar. 2016, doi:10.3390/ ijms17030327
- (6) Clement, G E, and T P Hartz. "Determination of the microscopic ionization constants of cysteine." Journal of chemical education vol. 48, 6 (1971): 395-7. doi:10.1021/ ed048p395
- (7) Koppula, Pranavi et al. "Cystine transporter SLC7A11/ xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy." Protein & cell vol. 12, 8 (2021): 599-620. doi:10.1007/s13238-020-00789-5
- (8) Chakravarthi, Seema, and Neil J Bulleid. "Glutathione is required to regulate the formation of native disulfide bonds within proteins entering the secretory pathway." The Journal of biological chemistry vol. 279, 38 (2004): 39872-9. doi:10.1074/jbc.M406912200
- (9) Ribas, Vicent et al. "Glutathione and mitochondria." Frontiers in pharmacology vol. 5 151. 1 Jul. 2014, doi:10.3389/fphar.2014.00151
- (10) Ketterer, B et al. "The role of glutathione in detoxication." Environmental health perspectives vol. 49 (1983): 59-69. doi:10.1289/ehp.834959
- (11) Chaudhari, Namrata et al. "A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress." Frontiers in cellular neuroscience vol. 8 213. 29 Jul. 2014, doi:10.3389/fncel.2014.00213
- (12) Ali, Amr S et al. "Multi-Omics Reveals Impact of Cysteine Feed Concentration and Resulting Redox Imbalance on Cellular Energy Metabolism and Specific Productivity in CHO Cell Bioprocessing." Biotechnology journal vol. 15, 8 (2020): e1900565. doi:10.1002/biot.201900565
- (13) Yu, Marcella et al. "Understanding the intracellular effect of enhanced nutrient feeding toward high titer antibody production process." Biotechnology and bioengineering

vol. 108, 5 (2011): 1078-88. doi:10.1002/bit.23031

- (14) Feeney, Lauren et al. "Eliminating tyrosine sequence variants in CHO cell lines producing recombinant monoclonal antibodies." Biotechnology and bioengineering vol. 110, 4 (2013): 1087-97. doi:10.1002/bit.24759
- Meganathan, R. "Ubiquinone biosynthesis in microorganisms." FEMS microbiology letters vol. 203, 2 (2001): 131-9. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10831.x
- (16) Shibafuji, Yusuke et al. "Cystine and tyrosine feed reduces oxidative and ER stress in CHO cells." Biotechnology journal vol. 18, 7 (2023): e2200638. doi:10.1002/biot. 202200638
- (17) Chen, Shifu et al. "fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor." Bioinformatics (Oxford, England) vol. 34, 17 (2018): i884-i890. doi:10.1093/bioinformatics/bty560
- (18) Dobin, Alexander et al. "STAR: ultrafast universal RNAseq aligner." Bioinformatics (Oxford, England) vol. 29, 1 (2013): 15-21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635
- (19) Li, Bo, and Colin N Dewey. "RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome." BMC bioinformatics vol. 12 323. 4 Aug. 2011, doi:10.1186/1471-2105-12-323
- (20) Robinson, Mark D et al. "edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data." Bioinformatics (Oxford, England) vol. 26, 1 (2010): 139-40. doi:10.1093/bioinformatics/btp616
- (21) Gessulat, Siegfried et al. "Prosit: proteome-wide prediction of peptide tandem mass spectra by deep learning." Nature methods vol. 16, 6 (2019): 509-518. doi:10.1038/s41592-019-0426-7
- (22) Yoshida, H et al. "Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors." The Journal of biological chemistry vol. 273, 50 (1998): 33741-9. doi:10.1074/jbc. 273.50.33741
- (23) Hetz, Claudio. "The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond." Nature reviews. Molecular cell biology vol. 13, 2 89-102. 18 Jan. 2012, doi:10.1038/nrm3270
- (24) Kilberg, M S et al. "Nutritional control of gene expression: how mammalian cells respond to amino acid limitation." Annual review of nutrition vol. 25 (2005): 59-85. doi: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132145
- (25) Hetz, Claudio et al. "Targeting the unfolded protein response in disease." Nature reviews. Drug discovery vol. 12, 9 (2013): 703-19. doi:10.1038/nrd3976
- (26) Liang, Jing et al. "Characterization of erasin (UBXD2): a new ER protein that promotes ER-associated protein degradation." Journal of cell science vol. 119,Pt 19 (2006): 4011-24. doi:10.1242/jcs.03163
- (27) Sun, Shengyi et al. "SellL is indispensable for mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation,

endoplasmic reticulum homeostasis, and survival." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America vol. 111, 5 (2014): E582-91. doi:10.1073/pnas.1318114111

- (28) Liu, Lintao et al. "GADD34 Facilitates Cell Death Resulting from Proteasome Inhibition." Anticancer research vol. 35, 10 (2015): 5317-24.
- (29) Bjørkøy, Geir et al. "Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1." Methods in enzymology vol. 452 (2009): 181-97. doi:10.1016/S0076-6879 (08)03612-4
- (30) Fukui, Masayuki, and Bao Ting Zhu. "Mitochondrial superoxide dismutase SOD2, but not cytosolic SOD1, plays a critical role in protection against glutamate-induced oxidative stress and cell death in HT22 neuronal cells." Free radical biology & medicine vol. 48, 6 (2010): 821-30. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.024
- (31) Zelko, Igor N et al. "Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression." Free radical biology & medicine vol. 33, 3 (2002): 337-49. doi:10.1016/s0891-5849 (02)00905-x
- (32) Paolicchi, Aldo et al. "Glutathione catabolism as a signaling mechanism." Biochemical pharmacology vol. 64, 5-6 (2002): 1027-35. doi:10.1016/s0006-2952 (02)01173-5
- (33) Xiang, Zhidan et al. "Mice lacking three Loci encoding 14 glutathione transferase genes: a novel tool for assigning function to the GSTP, GSTM, and GSTT families." Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals vol. 42, 6 (2014): 1074-83. doi:10.1124/dmd.113.056481
- (34) Rutter, Jared et al. "Succinate dehydrogenase Assembly, regulation and role in human disease." Mitochondrion vol. 10, 4 (2010): 393-401. doi:10.1016/j.mito.2010.03.001
- (35) Lushchak, Oleh V et al. "Aconitase post-translational modification as a key in linkage between Krebs cycle, iron homeostasis, redox signaling, and metabolism of reactive oxygen species." Redox report : communications in free radical research vol. 19, 1 (2014): 8-15. doi:10.1179/1351000 213Y.0000000073
- (36) Wang, Ying, and Siegfried Hekimi. "Understanding Ubiquinone." Trends in cell biology vol. 26, 5 (2016): 367-378. doi:10.1016/j.tcb.2015.12.007
- (37) Kalén, A et al. "Nonaprenyl-4-hydroxybenzoate transferase, an enzyme involved in ubiquinone biosynthesis, in the endoplasmic reticulum-Golgi system of rat liver." The Journal of biological chemistry vol. 265, 2 (1990): 1158-64.
- (38) Mugoni, Vera et al. "Ubiad1 is an antioxidant enzyme that regulates eNOS activity by CoQ10 synthesis." Cell vol. 152, 3 (2013): 504-18. doi:10.1016/j.cell.2013.01.013
- (39) Komatsu, Kei et al. "Effect of the disulfide isomerase PDIa4 on the antibody production of Chinese hamster ovary cells." Journal of bioscience and bioengineering vol. 130, 6 (2020): 637-643. doi:10.1016/j.jbiosc.2020.08.001