

CHL-YN 細胞の生細胞濃度向上に向けた 重要培地成分の検討

生物工学専攻 生物工学コース
大政研究室 空田 和也

I. 研究背景

バイオ医薬品は生物を用いて製造される医薬品の総称であり、例として、抗体、ホルモン、ワクチンなどが挙げられる。近年では、バイオ医薬品の中でも特に抗体医薬品が高い安全性と有効性を併せ持つ有望な医薬品として注目を集めている。チャイニーズハムスターの卵巢由来細胞（CHO 細胞）は、糖鎖修飾などの複雑な翻訳後修飾を行う能力や無血清培地への適応性を有していることから、抗体医薬品製造の宿主細胞として最も広く用いられている動物細胞である。しかしながら、CHO 細胞には大腸菌や酵母などの他の宿主細胞と比較して増殖が遅いという課題がある。この課題に対して、当研究室ではチャイニーズハムスター肺組織の初代培養から CHL-YN 細胞が樹立された^[1]。CHL-YN 細胞は従来の CHO 細胞より約 2 倍早く増殖するため、バイオ医薬品製造における開発期間の短縮が期待されている。CHL-YN 細胞の特長を最大限に活用するためには、高い増殖特性を支える適切な培地条件を確立することが重要である。CHL-YN 細胞の増殖を促進する重要な培地成分を特定することは、CHL-YN 細胞の産業応用に重要な指針を与えるとともに、高増殖特性の理解にもつながると考えられる。本研究では、CHL-YN 細胞の増殖に重要な培地成分を明らかにすることを目的とした。

動物細胞培養用の培地には 50 種類以上の成分が含まれていることが一般的であり^[2]、成分間の相互作用を考慮すると、各成分を個別に評価することは非効率的かつ現実的ではない。そこで本研究では、1) CHL-YN 細胞の細胞増殖を向上させる可能性がある培地成分のスクリーニング、2) スクリーニングされた成分の中からの重要培地成分の同定、の 2 段階で実験を進め、重要成分の検討を行った。

2. 実験方法

1 段階目の初期スクリーニングでは、培地ブレンディングにより培地条件を調製した。この方法では、12 種類の市販の無血清培地を混合することで 120 種類の異なる培地条件を作成し、CHL-YN 細胞を培養した。細胞増殖を向上させる可能性がある培地成分をスクリーニングするため、生細胞濃度（Viable cell concentration, VCC）を目的変数、培地成分の相対濃度を説明変数とする PLS-R（部分最小二乗回帰）モデルを構築した。成分の重要度の指標として VIP (Variable Importance in Projection) スコアを使用した。2 段階目の重要成分同定では、逐次後退選択法 (Sequential Backward Selection, SBS) を用いて、スクリーニングされた成分の中から重要成分を逐次的に同定した。生細胞濃度は Vi-CELL BLU (Beckman Coulter) で測定した。培地成分の相対濃度は LCMS-8060NX および ICPMS-2030 (島津製作所) を用いて測定した。細胞培養の生物学的レプリケートは N=3 とした。

3. 初期スクリーニング

CHL-YN 細胞を、培地ブレンディングにより調製した 120 種類の培地条件下で培養した結果、培養開始 69 時間（対数増殖後期から定常期）での生細胞濃度は 9.5×10^6 cells/mL から 19.5×10^6 cells/mL の範囲で変動した（図 1）。生細胞濃度を向上させる可能性がある培地成分をスクリーニングするために、培地成分の相対濃度を説明変数、生細胞濃度を目的変数とした PLS-R（部分最小二乗回帰モデル）を構築し、各培地成分の重要度算出のために VIP スコアを算出した。本研究では、VIP スコア上位 13 成分（アスパラギ

ン、シスチン、ロイシン、バリン、イソロイシン、グルコース、チロシン、スレオニン、メチオニン、ヒスチジン、リシン、フェニルアラニン、グルタミン酸) を生細胞濃度向上の可能性がある成分として同定した。その後、生細胞濃度が低かった培地条件にこれら 13 成分を添加する試験を行ったところ、最大生細胞濃度の向上が観察された(図 2)。

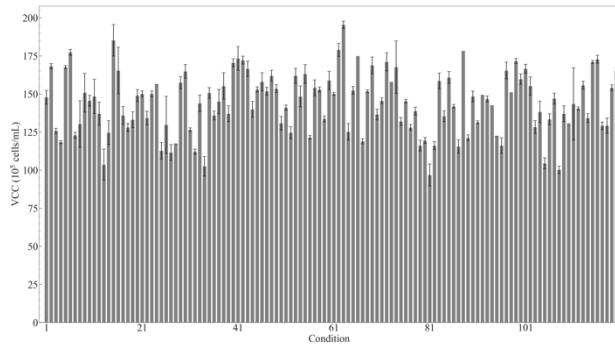


図 1：培養 69 時間における 120 条件の生細胞濃度 (VCC)。

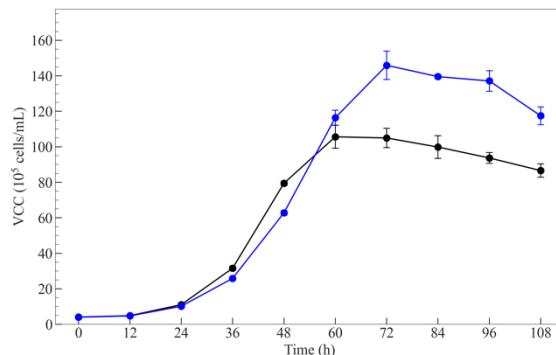


図 2：成分添加条件の生細胞濃度 (VCC) の経時変化。
黒色はコントロール、青色は 13 成分添加条件。

4. 重要成分の同定

初期スクリーニングでは、培地成分間の多重共線性(説明変数の中に相関係数が高い組み合わせの変数があること)を許容していた。そのため、選択された 13 成分の中には、生細胞濃度を真に向上去せる成分に加えて、疑似相関により見かけ上、重要度が高くなった成分も含まれている可能性が考えられた。本研究では逐次後退選択法(SBS)を用いて 13 成分の中に含まれる重要成分を逐次的に同定した。その結果、ロイシン、バリン、チロシン、メチオニン、リシン、およびフェニルアラニンの 6 成分が最大生細胞濃度を向上去せる重要な成分であることが示唆された(図 3)。これら 6 成分を補充した条件では、生細胞濃度のピークが $1.45 \times 10^7 \text{ cells/mL}$ であり、13 成分を添加した場合(図 2)と同程度の最大生細胞濃度が達成された。本研究の結果から、ロイシン、バリン、チロシン、メチオニン、リシン、およびフェニルアラニンが CHL-YN 細胞の最大生細胞濃度を向上去せることが示唆された。

5. まとめと展望

本研究では、培地ブレンディングと統計的手法を組み合わせることで、CHL-YN 細胞の細胞増殖に重要な成分の効率的な同定に成功し、ロイシン、バリン、チロシン、メチオニン、リシン、およびフェニルアラニンが生細胞濃度を向上去せる成分であることが示された。この知見は CHL-YN 細胞の高増殖特性の理解および高い増殖特性を支える適切な培地条件の開発につながり、CHL-YN 細胞の産業応用に重要な指針を与えると考えられる。

参考文献

- [1] Yamano-Adachi, N., et al., *Scientific Reports*, **10**:17612 (2020)
- [2] Galbraith, S.C. et al., *Current Opinion in Chemical Engineering*, **22**:42-47 (2018)

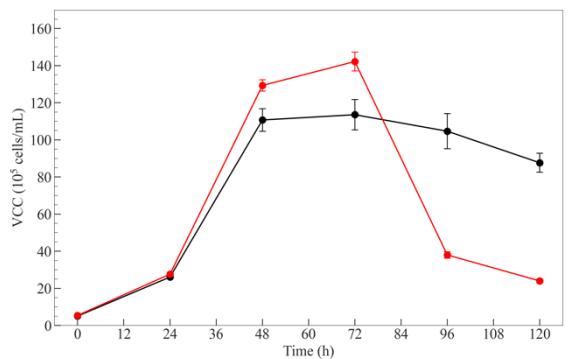


図 3：成分添加条件の生細胞濃度 (VCC) の経時変化。
黒色はコントロール、赤色は 6 成分添加条件。