

ユーザーベネフィット

- ◆ 簡便な前処理により培地や培養上清中の有機/無機成分をそれぞれ一斉分析可能です。
- ◆ 有機/無機成分を組み合わせた代謝解析が可能です。

■はじめに

抗体医薬品の原薬は、細胞を培養することで生産されます。昨今、宿主細胞の開発が盛んに行われており、大阪大学大政研究室にてチャイニーズハムスター肺由来細胞（CHL-YN細胞）が樹立されました¹⁾。CHL-YN細胞は、抗体生産に頻用されるCHO-K1細胞に比較して約2倍の増殖能を有します。本細胞の産業応用実現には、宿主細胞の代謝を理解することが重要ですが、CHL-YN細胞の代謝はまだ十分に調べられていません。

近年の研究では、培養液中の有機/無機成分の変動による抗体生産量や品質への影響について多くの報告があります。さらに有機/無機成分は培養液中で相互作用しながらその動態に影響することも知られている²⁾ため、代謝の理解には培養液中の有機/無機成分両方の分析が必要と考えられます。

そこで本アプリケーションニュースでは、CHL-YN細胞抗体生産株の培地/培養上清をサンプルとして、LC-MS/MS（LCMS-8060NX）を用いた有機成分144化合物、ICP-MS（ICPMS-2030）を用いた無機成分9元素を対象とした分析を行い、それらの統合データを用いて抗体生産に関わる成分や代謝経路を探索しましたので、ご紹介します。

■CHL-YN細胞の培養

CHL-YN細胞を表1に示す条件で培養し、24時間ごとに培養上清を回収しました（Biological replicates n=3）。

表1 培養条件

培養条件	
播種密度	1.0 x 10 ⁵ cells/mL
攪拌速度	90 rpm
温度 / 湿度 / CO ₂	37 °C / 80 % / 5 %

■培養上清の前処理方法

□ LC-MS/MS分析用の前処理

図1に示すように、培養上清中のタンパク質除去のため前処理を実施し、LC-MS/MS分析用のサンプルとしました。

□ ICP-MS分析用の前処理

図2に示すように、1%硝酸水溶液を用いて希釈のみ実施し、ICP-MS分析用のサンプルとしました。

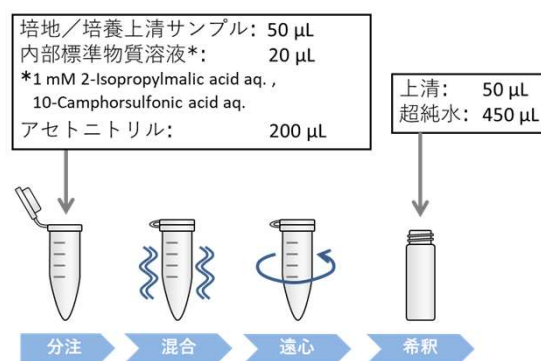


図1 LC-MS/MS分析用の前処理

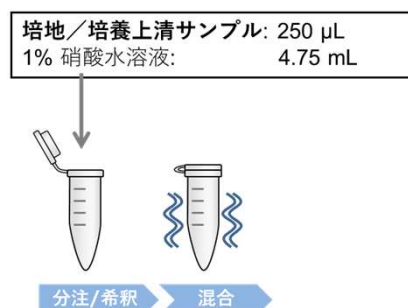


図2 ICP-MS分析用の前処理

■分析条件

□ LC-MS/MS

培養液中の有機成分の分析には、Nexera™ X3システムおよびLCMS-8060NXを用いました。

分析メソッドとしては「LC/MS/MSメソッドパッケージ 細胞培養プロファイリング Ver.3」を使用しました。本メソッドにより培地成分や分泌代謝物など細胞代謝に関わる計144成分*の一斉分析が可能です。

* 144成分の一覧は参考情報として表3に記載しています。

□ ICP-MS

無機成分の分析には、ICPMS-2030を用いました。ICPMS-2030での分析は、アプリケーションニュース 01-00372（ICPMS-2030を用いた培地中金属元素の分析）に記載の条件を用い、抗体生産に影響する報告のある元素を中心にCo, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Se, Znを分析しました。

■ 分析結果

□ LC-MS/MS分析結果

「LC/MS/MSメソッドパッケージ 細胞培養プロファイリング Ver.3」を用いた分析結果を、本メソッドパッケージに同梱のマルチオミクス解析パッケージを用いて可視しました（図3）。細胞培養プロファイリング Ver.3による培養上清分析で検出された74成分の経時変化を図4に示します。

このうち、特徴的な変化が観察された成分を図5および図6に示します。図5に示す成分は培養後期に枯渇した成分で

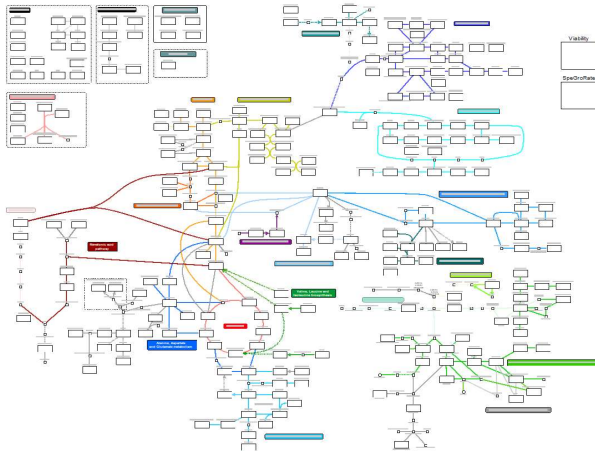


図3 白地図例（CHO細胞の代謝経路に最適化した白地図）

「LC/MS/MSメソッドパッケージ 細胞培養プロファイリング Ver.3」には登録成分に対応した「白地図」と呼ばれる結果投影用のテンプレートが3種類付属しています。目的に応じた白地図を選択することで、簡単に結果を一覧できます。

あり、フィード条件の検討につながる情報となり得ます。図6に示す成分は消費／分泌の方向が変化した成分であり、代謝のシフトを示唆する重要な情報と考えられます。

□ ICP-MS分析結果

ICP-MSの分析結果を図7に示します。測定対象の9元素すべての経時的な変化を測定できました。また、細胞による取込の有無やそのタイミングは元素ごとに異なることが示唆されました。



図4 細胞培養プロファイリング Ver.3による培養上清分析で検出された成分の経時変化一覧

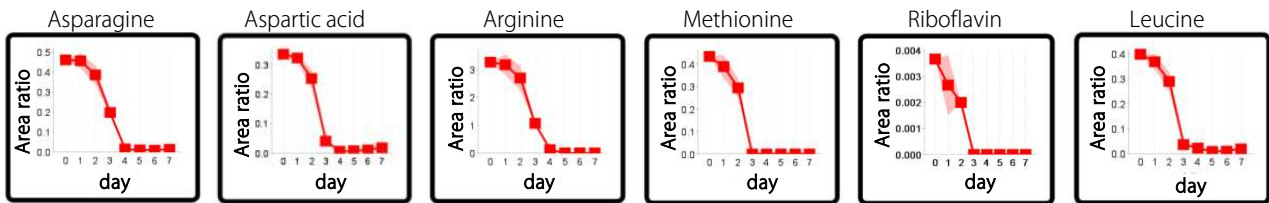


図5 細胞後期に枯渇していた有機成分

Area ratio（グラフ縦軸）：測定成分の面積値を内部標準物質の面積値で除した値
各点はBiological replicates n=3の平均値、影は誤差範囲

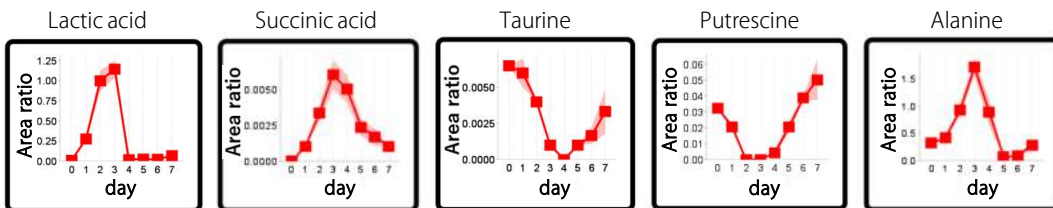


図6 消費／分泌の方向が変化した有機成分

Area ratio（グラフ縦軸）：測定成分の面積値を内部標準物質の面積値で除した値、
各点はBiological replicates n=3の平均値、影は誤差範囲

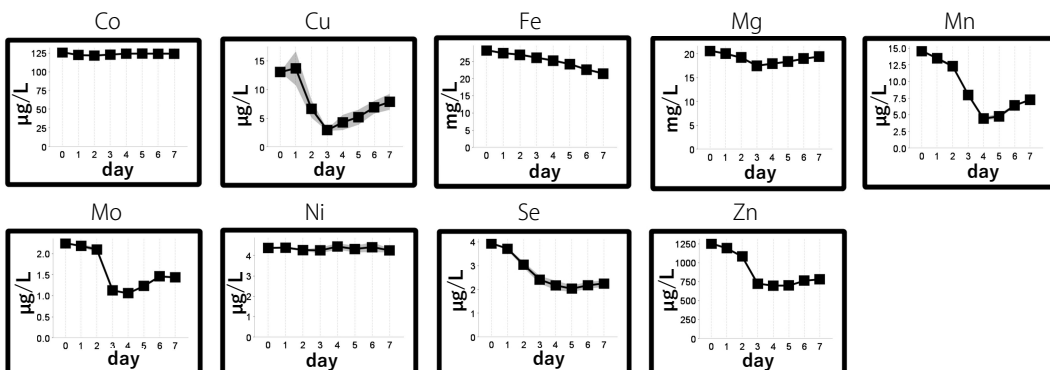


図7 ICP-MSを用いた培養上清分析結果

各点はBiological replicates n=3の平均値、影は誤差範囲。

■ データ解析

□ 相関解析

細胞の抗体生産能に関連する成分や代謝経路を同定するため、抗体比生産速度（1細胞が単位時間あたりに生産する抗体量）を目的変数とし、有機成分や無機成分の測定結果を説明変数として相関解析を実施しました。

相関解析ではcorrelation（相関係数）の絶対値が0.5よりも大きく、FDR（False Discovery Rate：擬陽性率）が0.05未満を満たす成分を、抗体比生産速度に対して相関のある成分として抽出しました。その結果、有機成分と無機成分の両方から条件を満たす成分を抽出できました。表2に正の相関があった成分（correlation（相関係数）> 0.5, FDR（擬陽性率）< 0.05を満たした成分）の一部を示します。

表2 correlation（相関係数）> 0.5, FDR（擬陽性率）< 0.05を満たした成分

*赤枠：無機成分

	correlation	FDR		correlation	FDR
SPR	1.00000	9.631600e-125	2-Aminoethanol	0.92712	2.399500e-07
Arginine	0.98120	3.064900e-11	Pyruvic acid	0.92587	2.508600e-07
Asparagine	0.97464	2.197200e-10	Mn-55	0.92508	2.513700e-07
Isoleucine	0.95867	7.686900e-09	Phenylalanine	0.91185	8.215200e-07
Serine	0.95756	7.686900e-09	Se-78	0.90977	9.065400e-07
Aspartic acid	0.95487	1.038400e-08	Pyridoxine	0.90916	9.065400e-07
Cystine	0.95382	1.066700e-08	Hexose (Glucose)	0.90389	1.317700e-06
Deoxycytidine	0.94914	1.990900e-08	Lysine	0.90095	1.568300e-06
Valine	0.94451	3.498800e-08	Zn-66	0.89172	2.793800e-06
Leucine	0.94143	4.806500e-08	Tyrosine	0.88603	3.933600e-06
			Glutamic acid	0.86884	1.044700e-05

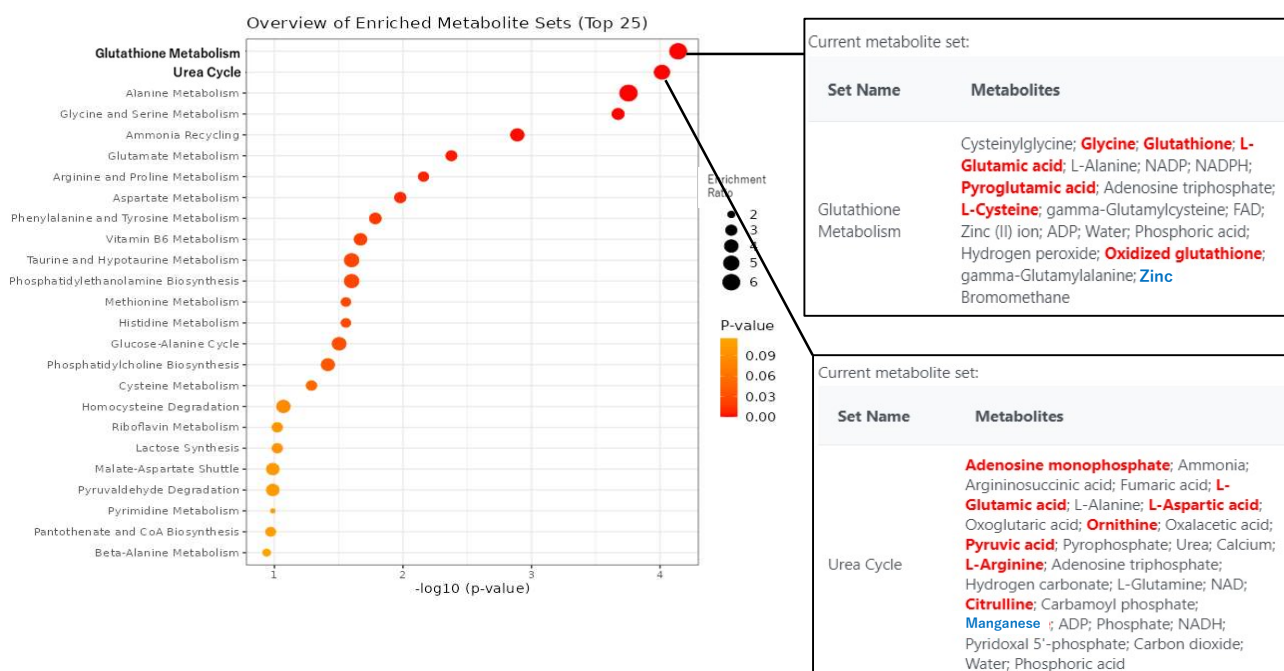


図8 エンリッチメント解析の結果

グルタチオン代謝と尿素回路がp値 < 0.0001となりました。各代謝経路のリファレンス成分リストのうち、相関解析で抽出された成分が色文字で示されています（赤字：有機成分、青字：無機成分）。

■まとめ

- ✓ 簡便な前処理により培地や培養上清中の有機成分および無機成分をそれぞれ一斉分析し、各成分の経時的変化を測定することができました。
- ✓ 枯渇する成分や、代謝シフトを示唆する成分を見出すことができました。
- ✓ 多成分の測定結果を用いて、抗体比生産速度を目的変数とした解析を実施することにより、抗体生産に相関する成分や特徴的な代謝経路を検出することができました。

当社LC-MS/MS (LCMS-8060NX*)とICP-MS (ICPMS-2030)を用いて培養上清中の成分を分析し、結果を解析することにより、抗体生産に関わる成分や代謝経路の検出が可能になるものと考えられます。

*「LC/MS/MSメソッドパッケージ 細胞培養プロファイリング Ver.3」はLCMS-8045/-8050/-8060(NX)に対応しております。

【謝辞】

本アプリケーションニュースは、大阪大学大学院 工学研究科 生物工学専攻 生物工学コース 大政研究室との共同研究の取組みの一部です。ご協力頂きました関係者の皆様に感謝申し上げます。

表3 LC/MS/MSメソッドパッケージ 細胞培養プロファイリング Ver.3 登録成分リスト
赤字：Ver.3で新たに追加された成分

Amino acids and their metabolites			Nucleic acids and their metabolites	Sugars
1-Methylhistidine	Glutamic acid	Serine	3-Aminoisobutyric acid	Gluconic acid
2-Amino adipic acid	Glutamine	Serotonin	3-Aminopropanoic acid	Hexose (Glucose)
2-Aminobutyric acid	Glutathione	Symmetric dimethylarginine	Adenine	Sucrose
2-Aminoethanol	Glycine	Threonine	Adenosine	Threonic acid
3-Hydroxyanthranilic acid	Glycyl-glutamine	Tryptophan	Adenosine monophosphate	
3-Hydroxyisobutyric acid	Histidine	Tyrosine	Cytidine	Others
3-Methyl-2-oxovaleric acid	Homocysteine	Urocanic acid	Cytidine 3',5'-cyclic monophosphate	2-Ketoglutaric acid
3-Methylhistidine	Homocystine	Valine	Cytidine monophosphate	Acotinic acid
4-Aminobutyric acid	Hydroxykynurenine		Cytosine	Citric acid
4-Hydroxyphenyllactic acid	Hydroxylsine	Vitamins	Deoxyadenosine	Fumaric acid
4-Hydroxyproline	Indole-3-acetic acid	4-Aminobenzoic acid	Deoxycytidine	Glyceric acid
5-Glutamylcysteine	Isoleucine	4-Pyridoxic acid	Deoxycytidine monophosphate	Glycolic acid
5-Hydroxytryptophan	Kynurenic acid	Acetylcholine	Deoxyguanosine	Glyoxylic acid
5'-Methylthioadenosine	Kynurenine	Ascorbic acid	Deoxyguanosine monophosphate	Isocitric acid
5-Oxoproline	Leucine	Biotin	Guanine	Lactic acid
Acetylcarnitine	Lysine	Choline	Guanosine	Malic acid
Alanine	Methionine	Citicoline	Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate	Mevalonic acid
Alanyl-glutamine	Methionine sulfoxide	Cyanocobalamin	Guanosine monophosphate	MVA-P
Anthranilic acid	N-Acetylaspartic acid	Folic acid	Hypoxanthine	Penicillin G
Arginine	N-Acetylcysteine	Lipoic acid	Inosine	Pyruvic acid
Argininosuccinic acid	Norepinephrine	NAD	Inosine monophosphate	Resveratrol
Asparagine	O-Phosphoethanolamine	Niacinamide	Orotic acid	Shikimic acid 3-phosphate
Aspartic acid	Ophthalmic acid	Nicotinic acid	Thymidine	Succinic acid
Asymmetric dimethylarginine	Ornithine	Pantothenic acid	Thymidine monophosphate	Taurine
Carnitine	Oxidized glutathione	Pyridoxal	Thymine	
Citrulline	Phenylalanine	Pyridoxalphosphate	Uracil	Internal standard
Creatine	Phenyllactic acid	Pyridoxine	Uric acid	2-Isopropylmalic acid
Cystathionine	Pipecolic acid	Riboflavin	Uridine	10-Camphorsulfonic acid
Cysteine	Proline		Uridine monophosphate	
Cystine	Putrescine		Xanthine	
Dopa	Saccharopine		Xanthosine	
Formylkynurenine	S-Adenosylhomocysteine		Xanthosine monophosphate	

LCMSおよびNexeraは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
https://www.an.shimadzu.co.jp/

初版発行：2023年2月
01-00498A-JP A改定版発行：2023年5月
島津コールセンター ☎ 0120-131691

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。本文書に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。なお、本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。