

Application News

液体クロマトグラフ質量分析計LCMSTM-8060NX
高速液体クロマトグラフ NexeraTM
ICP質量分析計ICPMS-2050

抗体の糖鎖プロファイル制御に向けた糖転移反応に関連する成分群の多角的解析

黒田 博隆^{1,2,3}、岡嶋 麻友¹、豊田健一¹、仲康佑¹、西風 隆司¹、中家修一¹
1 島津製作所、2 大阪大学大学院 工学研究科 生物工学専攻、3 島津分析イノベーション協働研究所

ユーザーベネフィット

- ◆ 複数の分析法を組み合わせることで糖転移反応に関連する原料（糖）・補因子（金属イオン）・基質（糖ヌクレオチド）・生成物（糖鎖）の多角的な解析が可能になります。
- ◆ 目的の糖鎖プロファイルを達成するための培養プロセス条件検討に役立ちます。

■はじめに

糖鎖は核酸やタンパク質に並ぶ“第三の生命鎖”とも呼ばれ、細胞機能やバイオ医薬品においてその役割が注目されています。その中でも、抗体に付加するN型糖鎖が薬効や安全性といった医薬品の品質に影響すると知られています。例えばコアフコシル化糖鎖の増加は抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性を向上させること、末端ガラクトシル化糖鎖の増加は補体依存性細胞傷害（CDC）活性の向上に寄与することが知られています¹⁾。そのため、糖鎖プロファイルは、抗体医薬品開発において重要品質特性（CQA）の一つとして管理され、目的の糖鎖が結合した抗体を安定的に得るため培養プロセス開発が推進されています。

糖鎖プロファイルの制御を目的とした効率的な培養条件探索のためには糖鎖が形成される機序に着目した戦略的な検討が期待されます。そこで、本アプリケーションニュースでは糖転移反応（図1）に着目し、原料（糖）・補因子（金属イオン）・基質（糖ヌクレオチド）といった多成分を分析しました。さらに、糖鎖形成におけるインプットからアウトプットまで多角的に解析した事例をご紹介します。

表1 培養条件

	条件1 (Control)	条件2 (+Mn)	条件3 (+Mn/+Gal)
Mn	無添加 (0.7 μM)	終濃度40 μM	
Gal	無添加 (0 g/L)		終濃度 5 g/L
播種密度	2.0 x 10 ⁵ cells/mL		
攪拌速度	140 rpm		
温度 / 湿度 / CO ₂	37 °C / 80 % / 5 %		
フィード	D-グルコース (2 g/Lを下回った時点から開始し、24時間ごとに終濃度4 g/Lになるよう添加)		

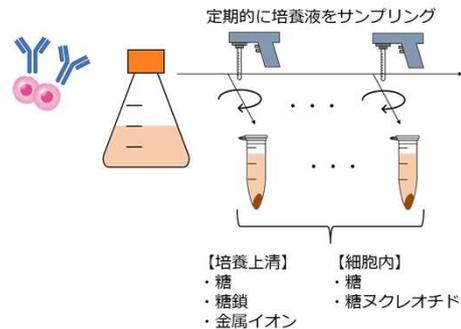


図2 培養系の概略図

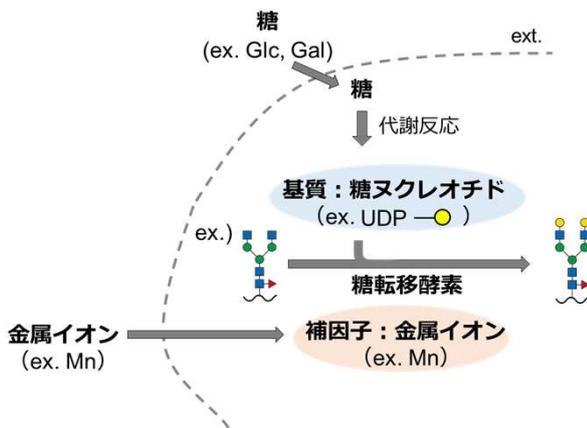


図1 糖転移反応の模式図
Glc : Glucose、Gal : Galactose

■ ガラクトシル化に着目したCHO細胞の培養 培養条件

本実験では、ガラクトシル化に着目し、基質原料のGalactoseおよび補因子のMnを表1に記載の条件で培地へ添加し、CHO-K1細胞IgG生産株をフラスコフェドバッチ培養しました。図2に示すように培養過程で定期的に培養液をサンプリングし、遠心分離により培養上清および細胞ペレットを回収しました（Biological replicates n=3）。培養上清は糖、糖鎖、金属イオンの分析に用い、細胞ペレットは糖ヌクレオチドの分析に用いました。

培養結果

生存率（Viability）および生細胞濃度（Viable Cell Concentration ; VCC）の経時変化を図3に示します。Mn添加条件およびMn/Galactose共添加条件いずれにおいてもControl条件と同等な結果が得られたため、細胞毒性なく成分添加培養を実施できたと考えられます。

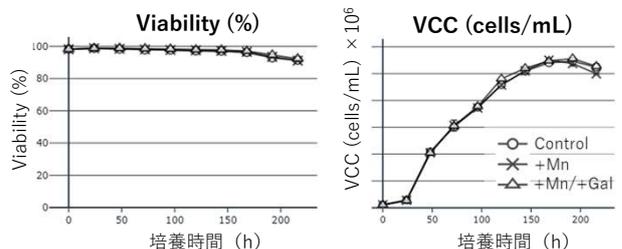


図3 生存率（Viability）と生細胞濃度（VCC）の経時変化

■ 培養試料の前処理方法と分析条件

培養上清中の金属イオン分析 (ICP-MS)

図4に示すように、培養上清を1(v/v)%硝酸と0.5(v/v)%塩酸の混合酸で20倍希釈し分析試料としました。

分析にはICPMS-2050を用い、アプリケーションニュース01-00712と同様の分析条件(表2)²⁾で、各分析試料中のMn濃度を測定しました。

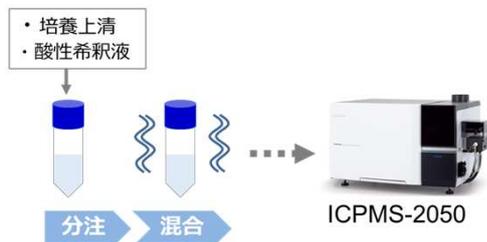


図4 培養上清中の金属分析用前処理の概略図

表2 金属イオンの分析条件

System	: ICPMS-2050
RF power	: 1.20 kW
Sampling depth	: 7.0 mm
Plasma gas flow rate	: 9.0 L/min
Auxiliary gas flowrate	: 1.10 L/min
Carrier Gas Flowrate	: 0.60 L/min
Dilution Gas Flowrate	: 0.25 L/min
Pump Speed	: 15 r.p.m.
Collision / Reaction Gas	: He / H ₂

培養上清中の糖分析 (LC-MS/MS)

培養上清中のタンパク質除去のため、図5に示すように培養上清とアセトニトリルを混合し遠心分離したのち、その上清を回収しました。回収した上清を10倍希釈し分析試料としました。

分析にはLCMS-8060を用い、LC/MS/MSメソッドパッケージ 糖・糖ヌクレオチドに登録された分析条件で、各分析試料中のGalactoseの相対濃度を測定しました。



図5 培養上清中の糖分析用前処理の概略図

細胞内の糖・糖ヌクレオチド分析 (LC-MS/MS)

図6に示すように、サンプリング後すぐに細胞ペレットを冷溶媒で懸濁し細胞代謝を停止させました。その後、メタノールや水を用いて細胞内成分を抽出しました。遠心エバポレーターにより溶媒乾固したのち、水で再溶解し分析試料としました。本プロトコルの詳細はLC/MS/MSメソッドパッケージ 糖・糖ヌクレオチドの取扱説明書に記載しています。

分析にはLCMS-8060を用い、LC/MS/MSメソッドパッケージ 糖・糖ヌクレオチドに登録された分析条件で、各分析試料中のGalactoseやUDP-Galactose(糖鎖へのガラクトース転移の反応基質)の相対濃度を測定しました^{*1}。

*1 単糖類と糖ヌクレオチド類は別の分析条件です。

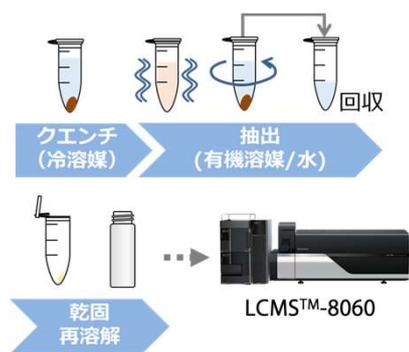


図6 細胞内の糖・糖ヌクレオチド分析用前処理の概略図

培養上清中抗体の糖鎖分析 (HPLC-RF)

培養上清中の抗体精製、糖鎖の遊離、蛍光標識はEZGlyco mAb-N Kit with 2-AB(住友ベークライト)を用いて実施しました。本キットでの前処理フローを図7に示します。今回アプライした抗体量は3-10 µg程度でした。

分析にはNexera XRを用い、表3の分析条件で分析しました。本条件での糖鎖標準試料の分析結果を図8に示しました。

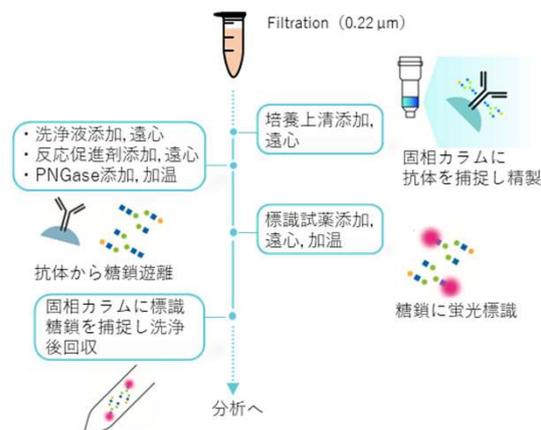


図7 EZGlyco mAb-N Kit with 2-ABを用いた培養上清の前処理

表3 糖鎖の分析条件

System	: Nexera XR
Column	: Shim-pack TM GIST-HP Amide [Metal free] (100 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 µm) ^{*2}
Mobile phases	: A) 100 mM ammonium formate (pH4.4) : B) Acetonitrile
Time program	: B Conc.78% (0 min)→69% (50 min)→50% (50.01-55 min)→78% (55.01-62 min)
Column temp.	: 40 °C
Flow rate	: 0.5 mL/min
Injection Volume	: 1 µL
Detection	: Fluorescence (Ex. 330 nm, Em. 420 nm) (using RF-20Axs, semi-microcell)

*2 P/N : 227-30951-02

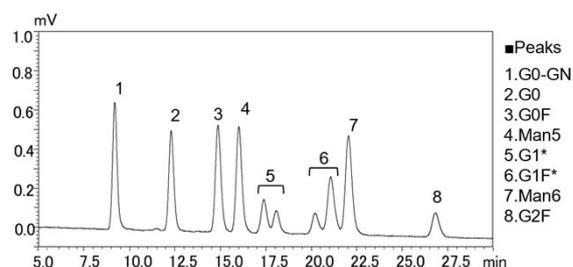


図8 糖鎖標準試料のクロマトグラム
ピーク5, 6ではGalactoseの構造異性体が分離検出されています。
(G1 : G1a, G1b, G1F : G1Fa, G1Fb)

■糖転移反応に関わる各種成分の分析結果

培養上清中のMn分析結果

Mn添加条件と無添加条件でMnの初期濃度が50倍以上異なるので、比較しやすいよう初期濃度を0としたときの経時変化を図9に示しました。さらに、1細胞あたりのMn取り込み速度を0時間と264時間の測定値より算出し、図10に示しました。図9, 10の結果より、Mnを添加した条件(Mnのみ添加およびMnとGalactoseを共添加)では、Control条件に比べてより多くのMnが細胞内に取り込まれることが示されました。

なお、MnとGalactoseを共添加した条件(+Mn/+Gal)での96時間培養の試料において高い測定値が記録されましたが、内標準元素を除いて、同時に測定したその他の全元素で同様の傾向を示したため、本測定値は試料調製工程での誤差と考えられます。

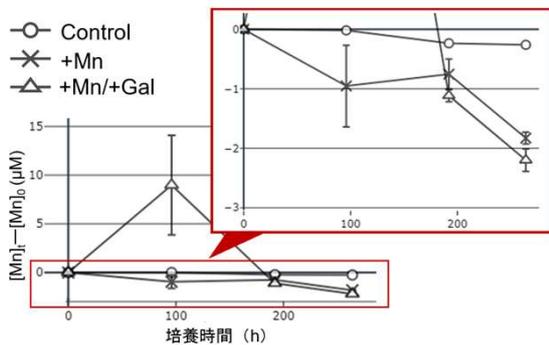


図9 Mn濃度の経時変化 (初期濃度からの差分を表示)

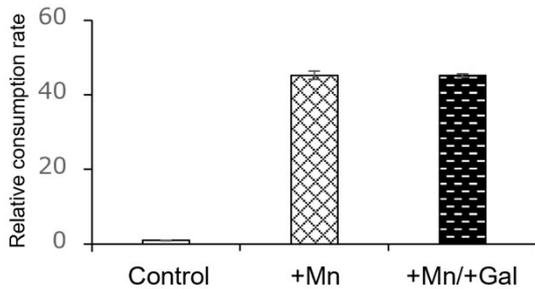


図10 1細胞あたりのMn比較取り込み速度 (Controlを1として表記)

細胞内外の糖・糖ヌクレオチドの分析結果

図11、図12に培養上清および細胞内分析用の試料測定時のマスクロマトグラムを示しました。メソッドパッケージ糖・糖ヌクレオチドを用いることで、目的としたGalactoseやUDP-Galactoseを各異性体から分離して測定することが出来ました。

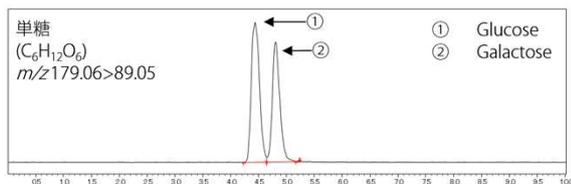


図11 培養上清試料のマスクロマトグラム

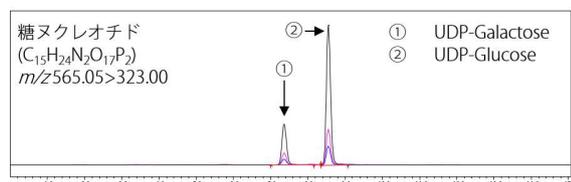


図12 細胞内抽出物試料のマスクロマトグラム

図13に細胞内外のGalactoseとUDP-Galactoseの時系列変化を示します。培養上清の分析結果より、MnとGalactoseを添加培養した条件(+Mn/+Gal)では、Galactoseが培養に伴い消費されることが示されました。さらに取り込まれたGalactoseがUDP-Galactose (Galactose転移反応の基質)に変換されたことも示唆されました。

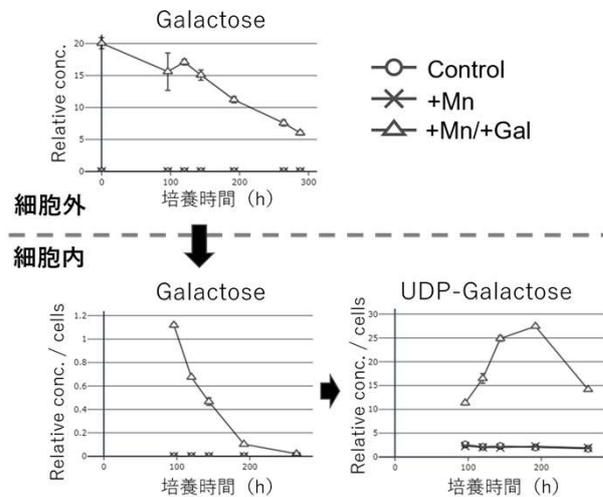


図13 細胞内外の糖・糖ヌクレオチドの経時変化

培養上清中抗体の糖鎖プロフィール

増殖期と定常期の試料について、条件間の糖鎖プロフィールを比較しました(図14)。その結果、ガラクトシル化糖鎖であるG1F*3とG2Fの割合が+Mn/+Gal > +Mn > Controlの順に多くなることが示されました。さらに、MnとGalactoseを添加培養した条件(+Mn/+Gal)でのみ、定常期でもガラクトシル化糖鎖の割合が維持されました。

*3 G1F : G1FaとG1Fbの合算値を記載

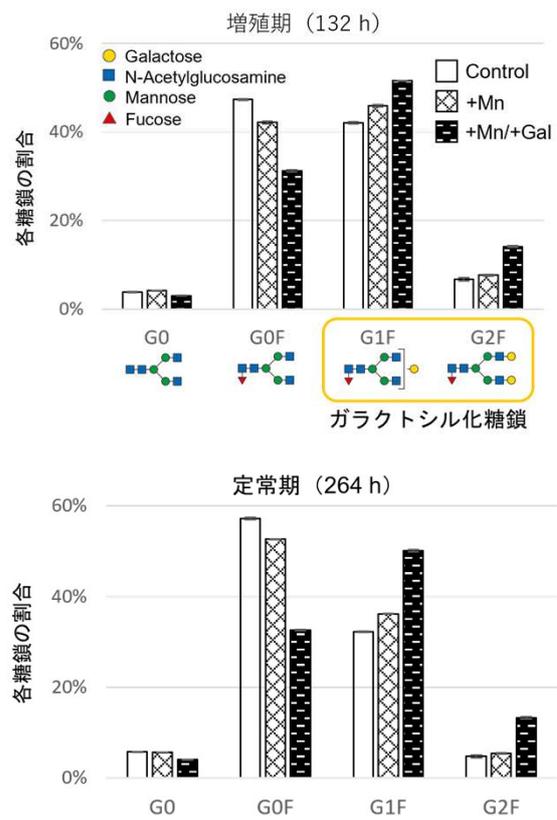


図14 培養上清中抗体の糖鎖プロフィール

■ まとめ

本アプリケーションニュースでは抗体のN型糖鎖形成に関わる糖転移反応に着目し、その原料（糖）や補因子（金属イオン）を添加して培養した試料を分析しました。特に今回はケーススタディとしてガラクトシル化に着目し、原料（Galactose）、補因子（Mn）、基質（UDP-Galactose）といった多成分を分析することで、ガラクトシル化糖鎖形成に関するインプットからアウトプットまでの流れを捉えることができました。

抗体の糖鎖プロファイルの制御は難易度の高い課題ですが、このように糖転移反応に関わる多成分を分析することで糖鎖プロファイル変化の根拠を得ることができ、糖鎖プロファイル制御に向けた戦略的な培養条件検討を可能にします。

<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。

<参考文献および関連アプリケーション>

- 1) Wang, Ziyang, Jianwei Zhu, and Huili Lu. 2020. "Antibody Glycosylation: Impact on Antibody Drug Characteristics and Quality Control." *Applied Microbiology and Biotechnology* 104 (5): 1905–14.
- 2) ICPMS-2050を用いた培地中の元素分析 (01-00712) https://www.an.shimadzu.co.jp/sites/an.shimadzu.co.jp/files/pim/pim_document_file/an_jp/applications/application_note/22642/an_01-00712-jp.pdf

■ 関連製品

OLC/MS/MSメソッドパッケージ 細胞培養プロファイリング

OLC/MS/MSメソッドパッケージ 一次代謝物

糖はエネルギー代謝やペントースリン酸経路にも利用されるため、糖の代謝をより深く理解するには、本アプリケーションニュースで用いたメソッドパッケージによる糖・糖ヌクレオチドの分析に加え、代謝成分の分析も有用な情報を提供すると期待されます。

図15に示すように、LC/MS/MSメソッドパッケージ 細胞培養プロファイリングやLC/MS/MSメソッドパッケージ 一次代謝物は、糖代謝に関連する細胞内外の多成分分析をより充実させ、糖鎖プロファイルの制御に向けた培養条件検討に深い洞察を与えます。

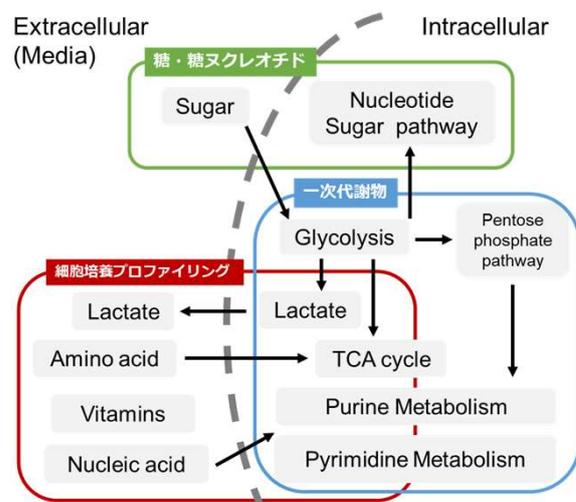


図 15 糖代謝に関連するLC/MS/MSメソッドパッケージ

Nexera, Shim-packおよびLCMS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：2024年4月
 01-00728A-JP A改訂版発行：2024年7月
 島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器、体外診断用医薬品として承認・認証を受けておりません。本文書に記載されている分析手法を治療診断目的およびその手続き上で使用することはできません。

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。本文中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。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

関連製品

一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



> LCMS-8060NX

トリプル四重極質量分析計



> ICPMS-2040/2050

ICP質量分析計



> LC/MS/MS メソッド パッケージ 糖・糖ヌク レオチド

LabSolutions™ LCMS用



> MUP-3100

抗体糖鎖自動前処理装置



> LCMS-TQ RX シリー ズ

トリプル四重極質量分析計

関連分野

> 医薬・バイオ医薬品

> バイオ医薬品

> ライフサイエンス

> グライコミクス

> 細胞培養 - 医薬品

> 価格お問い合わせ

> 製品お問い合わせ

> 技術お問い合わせ

> その他お問い合わせ