The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | UVC照射による抗体医薬品のヒスチジン残基の光酸化 |
| Author(s) | 宮原, 佑弥 |
| Citation | 大阪大学, 2021, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.18910/82176 |
| rights | |
| Note | |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

# 論　文　内　容　の　要　旨

| 氏　名　（宮原　佑弥） | |
|---|---|
| 論文題名 | UVC照射による抗体医薬品のヒスチジン残基の光酸化 |

論文内容の要旨

遺伝子組換えタンパク質医薬品が初めて承認されてから約30年が経過し、世界では100品目以上のバイオテクノロジーを応用した医薬品（バイオ医薬品）が承認されている。特に、高い特異性を持ちながらも、基本分子構造が共通するモノクローナル抗体（mAb）医薬品は、製造技術や分析技術を共通化することで盛んに開発が行われており、バイオ医薬品市場において主要製品となっている。mAbの設計・製造技術の高度化に伴い、mAbの品質管理への要求も高まっている。mAbのようなバイオ医薬品中の有効成分であるタンパク質は、精製、製剤化および保存中の化学・物理的ストレスにより化学修飾を受け一次構造が変化し、変性・凝集といった高次構造変化が起こる。その結果、医薬品としての、有効性および安全性が損なわれる懸念がある。最も重要な変化の一つはアミノ酸残基の側鎖の酸化であり、しばしばタンパク質の安定性および機能に多大な影響を及ぼす。またその原因の中でも光は、製造中や保存中に避けることができないストレス因子である。そこで、可視光（400 – 700 nm）および地表に到達する紫外線（UV：Ultraviolet）の成分であるUVA（320 – 400 nm）またはUVB（280 – 320 nm）によるタンパク質の分解や修飾に関する研究が進められてきた。

一方、UVをmAbの汚染リスク低減に積極的に用いようとする考えもある。世界中で開発が盛んなmAbであるが、製造過程でウイルスや細菌による汚染が多数報告されている。これらの汚染は、製造の中止や汚染源の特定など、広範な調査が必要となり、製造業者の被害は甚大である。そこでバイオ医薬品製造業者であるGenzyme社およびSanofi Pasteur社は、原材料の汚染リスクを低減するため、UVを外来性感染性物質の除去技術として有用であると報告している。紫外線殺菌照射（UVGI：Ultraviolet Germicidal Irradiation）においては、UVAまたはUVBよりも短波長側の高いエネルギーを有するUVC（280 nm以下）による照射の有効性が高いことが知られている。UVC照射は、微生物のデオキシリボ核酸（DNA：Deoxyribonucleic Acid）を損傷することによる殺菌に用いられている。またUVGIは医薬品製造における原材料に含まれるウイルスの不活化に有用であるという報告もなされている。UVGIの利点は、化学物質の添加が不要であること、シンプルな制御方法とメンテナンスにある。また微生物やウイルスの核酸に直接影響を及ぼすUVのユニークな作用機序も、ろ過や化学的不活性化などの技術を補完する点で有用である。その結果、ろ過が容易ではなく、化学物質に耐性を有する微生物やウイルスに対する処理方法として適用が期待されている。

このように、汚染リスクの低減に有効と考えられているUVC照射だが、一方で、タンパク質への影響も懸念されており、mAb中のメチオニン（Met：Methionine）残基の酸化や血清タンパク質中のジスルフィド結合の光分解などが報告されている。しかし、この分野に関する参照可能な研究が不足しているため、未だUVGIはmAb製造工程に実装されるに至っていない。したがって、UVC照射によるタンパク質の修飾および分解産物を同定し、各反応の機序を解明する必要がある。特に、光による影響を受けやすいイミダゾール基を持つヒスチジン（His：Histidine）は注目に値する研究対象である。mAbのFc領域に存在するHis残基は、抗体の機能に関与していることが報告されている。これまでに光照射の研究例として、光増感剤の存在下で、UVA照射によりHisがアスパラギン酸（Asp：Aspartic acid）およびアスパラギン（Asn：Asparagine）へと光酸化された例や、可視光（400 – 700 nm）とUVAの両方の照射により、mAb中のHis残基が光酸化された例が報告されているが、UVC照射によるmAb中のHis残基の光酸化機構や、その光酸化感受性について、報告例はほとんどない。

そこで本研究では、mAbのUVC光酸化の問題に取り組むため、UVCによる酸化生成物、特にHis残基由来のものを同定し、その反応機構の解明を目的とした。実験には、バイオ医薬品の特性解析及び品質試験においても広く利用されている液体クロマトグラフィー（LC：Liquid Chromatography）とタンデム質量分析（MS/MS：Tandem Mass Spectrometry）を組み合わせたLC/MS/MSを用いた。

第一章では、UVCによるmAbのHis残基への影響を明らかとするため、UVCを照射したmAbのLC/MS/MSを実施した。その結果、HisがAsp、iso-AspおよびAsnに光酸化されることを特定した。mAbにおいて観測されたUVC照射によるHis残

基の光酸化についての反応機構を調べるために、モデルペプチド（アンジオテンシンII）および$H_2{}^{18}O$を使用した解析を行った。この実験では、最終産物のAspおよびAsnならびに様々な化合物が同定された。しかし、UVAおよびUVBを照射した報告例で観測されたHisの酸素付加体は認められなかった。また溶媒である$H_2{}^{18}O$からの$^{18}O$原子は、予想に反して、Aspにのみ取り込まれ、Asnには取り込まれなかった。これらの結果を基に、UVCによるHis残基の酸化が純粋な光化学プロセスで進行することを示し、Hisのイミダゾール基と一重項酸素（$^1O_2$）の光誘起協奏反応を含む反応機構を考察した。次に第二章では、mAbにおけるHis残基の光酸化感受性に影響を与える要因を明らかとするため、各His残基の溶媒露出度、酸性度、イミダゾール基C2位の水素/重水素（H/D）交換の速度定数を算出した。算出された各パラメータとHis残基の光酸化感受性を比較したところ、各His残基の光酸化は、$pK_a$と相関があることを見出した。

以上の結果から、本研究では、2種類のmAb、アダリムマブとリツキシマブのHis残基が、UVC照射により光酸化され、他のアミノ酸へと変換することを特定した。またその反応は、一重項酸素とイミダゾール基の$C^{\gamma}$-$C^{\delta 2}$二重結合との光化学的［2+2］付加環化反応により進行することを明らかとした。さらに、mAb中のHis残基の光酸化に対する感受性が、各His残基の$pK_a$に依存することを示した。本研究結果は、mAbの製造、輸送、保管中に生じるタンパク質の光酸化に関する知見を与え、今後のUV照射による滅菌やウイルス不活性化研究を進めるための貴重な情報となることが期待される。

様式 7

# 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏　名　（　宮原　佑弥　） | | | |
|---|---|---|---|
| 論文審査担当者 | | （職） | 氏　名 |
| | 主 査 | 教授 | 大久保　忠恭 |
| | 副 査 | 教授 | 荒井　雅吉 |
| | 副 査 | 教授 | 高木　達也 |

## 論文審査の結果の要旨

本研究で申請者は、波長 280 nm 以下の UVC 照射による抗体医薬品の損傷を解明するために、主に質量分析法を駆使して研究を推進しヒスチジン残基の光酸化機構を明らかにした。高い特異性を持つ治療用モノクローナル抗体（mAb）はバイオ医薬品の主力となっているが、タンパク質であるため精製、製剤化、保存中のストレスにより化学修飾を受ける。これらの修飾による医薬品の不均一化と構造変化は有効性および安全性に影響をおよぼすため、その分解過程を明らかにする必要がある。中でも光の影響は、製造中や保存中に避けることができないストレス因子である。ヒスチジン（His）のイミダゾール基は、光による影響を受けやすいが、光によるバイオ医薬品の中のHisへの影響を評価した研究は少ない。波長320 - 400 nmのUVA光を照射すると、光増感剤の存在下でヒスチジン（His）が光酸化されてアスパラギン酸（Asp）およびアスパラギン（Asn）が生成することが報告されており、UVC光の照射は、より高いエネルギーを有するため、抗体医薬品にとって有害である可能性が示唆されている。一方、紫外線殺菌照射（UVGI：Ultra Violet Germicidal Irradiation）として知られるUVC照射は、微生物のDNAを損傷することによる殺菌に広く用いられているが、UVGIを抗体医薬品の製造工程に実装するには至っていない。

本研究では、主に質量分析（MS）及び液体クロマトグラフィー（LC）を用いてデータ測定を行っている。UVCの光源として、237 nmに発光ピークを有するPDUVL（Planar Deep Ultraviolet Light Source）を用いた。PDUVLによるUVC照射を2種類の抗体医薬品（アダリムマブおよびリツキシマブ）に行った後、個々のHis残基の修飾生成物をペプチドマッピングにより分析し、光酸化の時間経過をトリプシン消化物のベースピークイオンクロマトグラムの測定によりモニターしている。その結果、UVCを間照射することにより、両mAbにおいて、Hisが変化しAsp、Asnならびにそれらの誘導体が同定されている。標準可視光源であるD65ランプ曝露下におけるヒスチジンの酸化生成物として［4+2］環化付加生成物が観測されるが、UVCランプによる本実験では検出されていない。mAbにおいて観測されたUVCによるHisの修飾についての反応機構を調べるために、8残基のアンジオテンシンIIと$H_2{}^{18}O$を用いた実験を行っている。その結果から、本研究における光酸化のメカニズムとして、ジオキセタン（Dox）環を含む中間体を形成する一重項酸素と$C^{\gamma}$–$C^{\delta2}$イミダゾール基の二重結合との光化学的［2+2］付加環化反応を提唱している。アンジオテンシンIIへのUVC照射実験では、Hisの光酸化において、溶媒である$H_2{}^{18}O$からの$^{18}O$原子は、Aspにのみ取り込まれ、Asnには取り込まれていない。この結果は、UVC照射が一重項酸素を生成し、[2+2]環化付加を誘発して、Hisの$C^{\gamma}$-$C^{\delta2}$結合を含むDoxを形成することを示している。これは熱条件下では対称禁制とされているが、光化学的には対称許容である。得られたDoxは、逆光化学的[2+2]環化付加を経て中間体を形成し、中間体は加水分解によりAspまたはAsnのいずれかを生成すると考えられた。さらに、酸化レベルと$pK_a$の間に高い相関が見られ、His残基の光酸化に対する感受性が、各His残基の$pK_a$に依存することが明らかとなり、イミダゾール基がプロトン化される酸性条件では、His残基へのUVCによる光酸化を回避できる可能性が示された。

本研究結果は、抗体医薬品の製造、輸送、保管中に生じるタンパク質の分解機構を明らかにしたものであり、その意義は大きく、UV殺菌装置の設計と実験における貴重な情報となり、UVによる滅菌やウイルス不活性化に関して有用な知見を与えるものであると考えられ博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。