

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15156

研究課題名(和文) 特異体質性副作用誘発特性を予測するインシリコ手法の構築

研究課題名(英文) Development of in silico prediction method for idiosyncratic adverse reactions associated with HLA genotypes

研究代表者

鈴木 洋史 (Suzuki, Hiroshi)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80206523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、HLAタンパク質と薬物分子の相互作用を予測するためのドッキングシミュレーション手法の構築を目指し、過去に報告されているcarbamazepine分子とHLA-B*15:02の相互作用部位の同定検討からスタートしたが、過去に報告されているHLAタンパク質表面へのcarbamazepine分子の結合は再現性が無く、相互作用しない可能性が高いと考えられた。また、対応するT細胞受容体に対しての相互作用も検出されなかった。carbamazepine分子とHLAタンパク質の相互作用には、提示されている抗原ペプチドの配列特異性が存在する可能性が示唆され、今後ペプチド配列の特定が必須である。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to develop an in silico prediction method for interaction between HLA protein and drug molecules. At the beginning, we analyzed the binding site of carbamazepine to HLA-B*15:02, however; the binding of carbamazepine to HLA-B*15:02 protein surface, which was reported previously, was not reproducible and it seems not correct that carbamazepine binds to the molecular surface of HLA protein. We also evaluated the interaction between carbamazepine and corresponding TCR clonotype but the interaction was not detected. A series of experimental results indicated the possibility that presented antigen peptide is responsible for determining the interaction between carbamazepine and HLA protein.

研究分野：医療薬学

キーワード：薬剤反応性 薬理学 免疫学 トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

医薬品の副作用は中毒性機序と特異体質性機序によるものに大別できる。中毒性機序の副作用に関しては、種々の毒性スクリーニング手法や動物モデル、オフターゲット相互作用の包括的測定など、創薬段階で様々なリスク評価手法が利用可能である。一方、特異体質性機序の副作用に関しては、スティーブンス・ジョンソン症候群 (SJS) /中毒性表皮壊死症 (TEN)・薬物性過敏症・薬物性劇症肝炎など、時に生命の危機を伴うほどの重篤な症例が多く含まれるにも関わらず、創薬段階でこのリスクを評価できる手法は全く確立されていない。

近年、特異体質性副作用の発症と患者遺伝背景の関連性に着目した臨床研究が数多く行われ、ヒト白血球型抗原 (HLA) の遺伝子型と相関性が認められるケースが多いことが明らかとなってきた (Pavlos Ret al, Annu Rev Med. 2015)。また最近では、その分子機構に着目した研究も複数行われており、特に、重篤な過敏症を引き起こす abacavir と HLA-B*57:01 の組み合わせに関して理解が進んでいる。HLA-B*57:01 タンパク質の成熟過程において、抗原提示溝内側に位置する F ポケット (抗原ペプチドの C 末端残基が結合) に対して abacavir 分子が結合し、立体障害が要因となって、提示されるペプチドレパートリーが変化することが、免疫応答活性化に繋がることが示されている (Illing PT et al. Nature. 2012)。

一方、carbamazepine による SJS 発症と強い相関が知られる HLA-B*15:02 に関しても検討を行ったが、abacavir で認められるような抗原結合溝内部への薬物分子の結合は観察されなかった。過去に、carbamazepine 分子が HLA-B*15:02 タンパク質の表面に対して、mM オーダーの弱い親和性で結合する、という報告 (Wei et al, J Allergy Clin Immunol, 2012) があるものの、結合部位などに関する解析は報告されていなかった。

我々もこれまで独立して検討を進めてきており、特異体質性の副作用発現と Class I HLA 遺伝子型の関連が報告されている多数の薬物に関して、HLA タンパク質発現系を構築し、abacavir のケースと同様に、抗原結合溝内部に薬物分子の結合が認められるか否かを解析した。その結果、nevirapine による過敏症発現と相関する HLA-B*35:05 に関しては、abacavir のケースと同様に、nevirapine 分子が HLA-B*35:05 タンパク質の F ポケットに結合して、ペプチドレパートリーに変化が生じることが見出された。一方、carbamazepine や allopurinol を含む多くの化合物において、HLA タンパク質の抗原結合溝内部への薬物分子の結合は認められなかった。

これらの背景を踏まえ、abacavir あるいは nevirapine のケースで認められるような相互作用様式は、薬物分子と HLA タンパク質の相互作用様式としては、あまり一般的とは言

えず、むしろ過去に carbamazepine に関して報告されているような、HLA タンパク質の表面に対する弱い相互作用が一般的な可能性があると考え、このような相互作用を予測するための in silico シミュレーション手法の構築が有用であると考え、本研究の立案に至った。

2. 研究の目的

本研究では、HLA タンパク質に対して一般に薬物分子が結合し得るポケットの位置を同定した上で、各ポケットの位置を指定した上で、in silico ドッキングシミュレーションを行う事で、未知の組み合わせで HLA タンパク質と薬物分子の相互作用を予測できる手法の構築を目指すこととした。

本研究の完成により、創薬段階における予測法が無かった特異体質性の副作用に関し、その誘発リスクを評価する手法が提供され、安全性の高い医薬品の創出に貢献すると考えられた。また、これまで未知であった新規の組み合わせで、HLA タンパク質と薬物分子が相互作用するケースが見出され、従来の研究では見逃されてきた HLA 遺伝子型と薬物副作用の関連性が包括的に明らかになる事で、不明な部分が多く残されている特異体質性薬物副作用発現の全体像解明に向けて、重要な基盤情報が得られる可能性が期待された。

3. 研究の方法

3-1. carbamazepine に関して報告されている HLA-B*15:02 タンパク質との相互作用に関する検証

HLA タンパク質と薬物分子の相互作用を予測するためのドッキングシミュレーションを精度良く行うためには、薬物分子が相互作用する可能性のある部位を予め特定する事が必要となる。そこで、過去の報告によって HLA タンパク質の表面に弱い親和性で相互作用する事が報告されている carbamazepine に関して、解析を開始することとした。薬物分子の結合部位を推定するためには、アラニンスキャンの手法を用いて、HLA タンパク質の表面残基に関する変異体スクリーニングを行う事が有用と考えられた。そこでまず、過去の報告と同様の手法を用い、HLA-B*15:02 タンパク質を調製し、表面プラスモン共鳴手法によって、carbamazepine 分子との相互作用検出を試みた。

3-2. carbamazepine 存在下で HLA-B*15:02 依存的に T 細胞を活性化する事が報告されている T 細胞受容体に対する carbamazepine 分子の相互作用に関する解析

3-1 の検討では、様々な条件検討を慎重に行った上で評価を進めたが、論文報告の結果は再現されず、carbamazepine 分子が HLA タンパク質の表面に相互作用する可能性は見出されなかった。そこで、carbamazepine 分子が特定の配列を有する T 細胞受容体に相

相互作用することで、特異体質性の副作用を引き起こす原因になっている可能性についても検証を加えることとした。carbamazepine 存在下で、HLA-B*15:02 による T 細胞活性化が引き起こされる事が報告されている T 細胞受容体に関して、発現系の構築と組み換えタンパク質の取得を行い、表面プラスモン共鳴手法によって carbamazepine 分子との相互作用の検出を行った。

3-3. carbamazepine 分子と HLA タンパク質の相互作用に、特定の抗原ペプチドが必要となる可能性の検証

哺乳類細胞発現系を用いて調製した HLA タンパク質には、多様な抗原ペプチドが担持されている。そのため、carbamazepine 分子と HLA タンパク質の相互作用が、HLA タンパク質の表面部分では無く、抗原ペプチドを提示している部位周辺で、提示しているペプチド配列に依存的に生じる場合には、3-1 で検討した手法では、相互作用が検出されないことと矛盾しないと考えられる。そこで、この点に関してさらに確認することとした。3-2 の検討で構築した T 細胞受容体の組換えタンパク質をセンサーチップ上に固定し、HLA タンパク質との相互作用が、carbamazepine の暴露条件下で変化するか否かを検証した。

4. 研究成果

4-1. Carbamazepine に関して報告されている HLA-B*15:02 タンパク質との相互作用に関する検証

過去の報告と同様の実験系を用い、HLA タンパク質の carbamazepine の相互作用検出を試みたが、全く意外なことに、過去に報告されている手法では、相互作用は検出されなかった。過去の報告では、精製した HLA タンパク質を、Biacore のセンサーチップ (CM5) 上に、アミド結合を形成するクロスリンカーである EDC を用いて固定する方法が用いられていた。そこで、HLA タンパク質の立体構造を認識する W6/32 抗体との相互作用を検討したところ、アミド結合形成によってセンサーチップに固定された HLA タンパク質は、W6/32 抗体によって認識されず、立体構造が変性していることが明らかとなった。そこで、HLA タンパク質の α 鎖 C 末端にタンデム His タグ (6×His タグを、スペーサーを挟んで 2 回タンデムに連結したタグ) を付加したコンストラクトを作成し、Ni-NTA センサーチップを用いて、HLA タンパク質を非共有結合的にセンサーチップ上に固定する手法を考案した。上述と同様に W6/32 抗体を用いて評価した結果、大部分の HLA タンパク質が立体構造を保った状態でセンサーチップ上に固定出来ている事が確認された。この改良評価系を用いて、再び carbamazepine 分子の相互作用を評価したが、残念ながら carbamazepine 分子と HLA タンパク質の相互作用は検出されなかった。また、carbamazepine と HLA-B*15:02 の相互

作用を報告したグループと同一のグループから、HLA-B*58:01 と allopurinol の相互作用に関しても、同様の報告が 2015 年に行われたため (Lin et al, J Allergy Clin Immunol, 2015)、この点に関しても同様に検証を加えたが、やはり再現性は得られなかった。

4-2. carbamazepine 存在下で HLA-B*15:02 依存的に T 細胞を活性化する事が報告されている T 細胞受容体に対する carbamazepine 分子の相互作用に関する解析

4-1 の検討結果を通じて、carbamazepine 分子が HLA-B*15:02 タンパク質の表面に弱く結合する可能性は低いと判断した。そこで、HLA 遺伝子型に依存的な特異体質性副作用の発現が生じる他の可能性に関して検討を加えることとした。carbamazepine の存在下においてのみ、HLA-B*15:02 依存的な T 細胞の活性化を引き起こす T 細胞受容体のアミノ酸配列が報告されている (Ko TM et al, J Allergy Clin Immunol, 2011)。そこで、可能性の一つとして、このような特定の T 細胞受容体に対して carbamazepine の相互作用が生じる可能性に関しても、検証を加えた。当該配列の T 細胞受容体 α 鎖の C 末端にタンデム His タグを、 β 鎖の C 末端に flag タグを付加したコンストラクトを作成し、flag タグに対するアフィニティ・クロマトグラフィーを用いて精製した T 細胞受容体タンパク質を、Ni-NTA センサーチップに対して固定化し、表面プラスモン共鳴手法を用いて、T 細胞受容体と carbamazepine の相互作用を測定した。しかしながら、T 細胞受容体組み換えタンパク質と carbamazepine 分子の相互作用は検出されなかった。

4-3. carbamazepine 分子と HLA タンパク質の相互作用に、特定の抗原ペプチドが必要となる可能性の検証

carbamazepine 存在下で、HLA-B*15:02 による T 細胞活性化を引き起こす T 細胞受容体の組換えタンパク質をセンサーチップ表面へ固定し、carbamazepine の存在下および非存在下で、培養細胞に産生させた多様な配列の抗原ペプチドを提示する組換え HLA タンパク質を流路に添加し、表面プラスモン共鳴手法による相互作用の計測を行った。陽性対照として、相互作用することが既知の抗原ペプチドと T 細胞受容体の組み合わせを準備し、単一の合成ペプチドを添加して巻き戻し法によって調製した HLA タンパク質を、対応するクロノタイプの T 細胞受容体を固定したセンサーチップを用いて評価し、強い相互作用シグナルが検出されることを確認した。一方で、carbamazepine 応答性の T 細胞受容体と多様な抗原ペプチドを提示した HLA タンパク質の組み合わせにおいては、carbamazepine 依存的に有意なシグナルの増強は観察されず、多様な抗原ペプチドを提示する HLA タンパク質の存在下では、バックグラウンドに隠

れて相互作用は認められない結果と考えられた。

4-5. 結論および考察

本研究の結果、過去に報告されている HLA タンパク質表面への carbamazepine 分子の弱い相互作用は、再現性が無く、相互作用しない可能性が高いと考えられた。また、対応する T 細胞受容体に対して carbamazepine 分子が相互作用する可能性も低いと考えられた。一連の検討結果は、carbamazepine 分子と HLA タンパク質の相互作用には、提示されている抗原ペプチドの配列特異性が存在する可能性を示唆しており、該当するペプチド配列を特定するための検討が必要になると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

① Nishiki Nagaya, Masashi Honma, Yoshiaki Kariya, Tomoki Kato, Yuki Ikebuchi, Hiroshi Suzuki. Analysis of interactions between HLA proteins and drug molecules which lead to the development of idiosyncratic adverse reactions. 6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2017, Stockholm, Sweden

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 洋史 (SUZUKI, Hiroshi)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：80206523

(2) 研究分担者

本間 雅 (HONMA, Masashi)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60401072