

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月4日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659029

研究課題名（和文） アバカビルによる過敏症発症機構の解析

研究課題名（英文） Mechanism analysis of abacavir hypersensitivity.

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

研究成果の概要（和文）： HLA-B*5701 保因者におけるアバカビル過敏症では、従来の知見より想定されたプロテインアダクト由来のペプチドではなく、アバカビルそのものが異常抗原として抗原提示されている可能性が示唆された。同様の機序により副作用が発生する場合、従来のプロテインアダクト量に基づいたスクリーニング系では、リスク評価が不能であり、HLA 多型特異的に薬物（もしくは代謝物）が提示されるか否かを判別する評価系を組み合わせることにより、予測精度が向上する可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）： In abacavir hypersensitivity associated with HLA-B*5701 gene carriers, it is strongly suggested that the causal antigen is not peptides derived from protein adducts, as is assumed previously, but the abacavir itself. In the other cases caused by the same mechanism with abacavir hypersensitivity, the existing screening system based on the amount of protein adducts formation cannot find out the risk of adverse effect. The combination with the new screening system to discriminate if the drugs or their metabolites are presented as antigen will improve the prediction accuracy of idiosyncratic adverse effect .

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	360,000	3,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬剤反応性、特異体質性毒性、プロテオーム、免疫応答、HLA、アバカビル

1. 研究開始当初の背景

薬物の副作用は、中毒性機序と特異体質性機序によるものに大別できる。中毒性の副作用に関しては基本的に動物モデルの構築と評価が可能であるが、特異体質性副作用に関するモデルは確立されていない。一方で特異体質性の副作用には、アナフィラキシー・ショック、スティー

ブンス・ジョンソン症候群、劇症肝炎など、非常に重篤な症状を呈する例が多く含まれており、臨床上、最重要の未解決課題となっている。近年、幾つかの特異体質性副作用と HLA 遺伝子多型の間に、密接な相関が見出されてきており (Hung et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005)、その関連性を説明可能なスキームとして、A. 薬

物の反応性代謝物が細胞内タンパク質に付加し、**B.** 生成した異常タンパク質の分解物が、特定の遺伝子型の HLA でのみ抗原提示され、**C.** 免疫系の活性化が生じて副作用発症につながる、という一連の反応が仮説として提唱されている。**A.** に関しては、共有結合性のタンパク質付加物を多く生成する薬物ほど、特異体質性副作用が発現する傾向にあると報告されており (Nakayama et al. Drug Metab Dispos. 2009)、また **C.** に関しては、アバカビルに対する過敏症発症は、細胞障害性 T 細胞の活性化を介することが報告されている (Chessman et al. Immunity 2008)。しかしながら、**B.** に関して解析に成功した例は存在しなかった。

2. 研究の目的

申請者らは、上記背景に基づき、HLA によって異常ペプチドが提示されるメカニズムを解析することが必須であると考えた。そこで得ケースとして、アバカビルによる過敏症発症が HLA-B*5701 保因者のみで生じる分子メカニズムを、HLA を介した抗原提示の過程に焦点を絞って解明することを目標として、過敏症時に提示されている異常抗原の同定を試みることにした。異常抗原の候補としては、薬物の反応性代謝物が共有結合性に付加したタンパク質 (プロテインアダクト) 由来の薬物付加ペプチドに加え、②薬物分子そのもの、③薬物刺激下でのみ生じる何らかの異常ペプチド (プロテインアダクト由来の、薬物付加が無いペプチドなど) の 3 通りを想定し、これらを順に検討することとした。これらの解析により、これまで不明であった「何故特定の HLA 多型でだけ、免疫系の活性化が生じるのか？」という肝要な部分の分子メカニズムを解明できることが期待された。

3. 研究の方法

プラスミド構築

HLA-B*5701 遺伝子は I.M.A.G.E. クローン (OpenBiosystems) を購入した。HLA-B*5703 遺伝子は site directed mutagenesis の手法により HLA-B*5701 遺伝子の特定の 2 塩基に変異導入し (open reading frame の 412 番目の G→A、419 番目の C→A) 作成した。さらに、これらの遺伝子に GFP と 6xHis tag を付与したタンパク質を発現する発現ベクターを構築した。

細胞

C1R 細胞 (HMY2.C1R) は ATCC (American Type Culture Collection) より購入した。C1R 細胞はヒト Bリンパ芽球由来浮遊細胞であり、MHC クラス I 分子のうち HLA-A,B が完全欠損していることが知られている。C1R 細胞は 10%FBS (Biofill Australia), 1%ペニシリン-ストレプトマイシン (ナカライテスク) を添加した RPMI1640 培地 (ナカライテスク) にて 2×10^5 cells/ml ~ 1×10^6 cells/ml の細胞密度で培養した。基本的に

は 10cm シャーレ (Greiner) または 15cm シャーレ (Orange Scientific) にて培養を行ったが、後述の Alkynyl ABC 付加ペプチドを回収する際には大規模培養のため、浮遊細胞培養用バッグである Cultilife Eva (タカラバイオ) を用いた。

HLA 発現 C1R 細胞の構築

上記の HLA-B*5701 または 5703-GFP-his を C1R 細胞にエレクトロポレーション法で導入し (110V, $950 \mu\text{F}$)、導入後 48 時間後から G418 (ナカライテスク) 溶液を添加した RPMI1640 培地にて培養し、導入細胞を選択後、さらにフローサイトメトリーを委託し (リプロセル社)、GFP 陽性細胞のみを分離した。HLA 発現 C1R 細胞は C1R 細胞用培地に G418 を添加して培養した。以下、HLA-B*5701 発現 C1R 細胞を B*5701-C1R、HLA-B*5703 発現 C1R 細胞を B*5703-C1R、遺伝子導入していない C1R 細胞を parent C1R と記載した。

Alkynyl ABC の合成

Alkynyl ABC の合成は、アバカビルの合成前駆体である (1S,4R)-4-(2-Amino-6-chloro-9H-purin-9-yl)-2-cyclopentene-1-methanol Hydrochloride (santa cruz biotechnology) を脱水メタノール (和光純薬) 中にて、8 等量の propargylamine (SIGMA) と 60°C の水浴で 12 時間加温・攪拌することで行った。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより原料と生成物 (alkynyl ABC) に分離した。得られた生成物の分子量を質量分析により測定し、alkynyl ABC の合成と精製を確認した。

細胞表面上の Alkynyl ABC 付加ペプチドの回収法

a. 細胞培養条: B*5701-C1R, B*5703-C1R, parent C1R 各々 1×10^8 cells/L に、終濃度 30 mg/L で alkynyl ABC を添加し、培養した。
b. 細胞表面からのペプチド回収法: 培養した細胞を 780 g、2 分遠心・回収し、HBSS で 6 回洗浄することで培地中の Alkynyl ABC を除いた。洗浄した細胞を citric-phosphate buffer pH3.0 (0.133M citric acid, 0.066M Na_2HPO_4) を添加して 1 分静置後、遠心上清を回収した。この acid elute をさらに 2 回行い、3 回分の eluate をペプチド画分として回収した。
c. ペプチドの脱塩・濃縮: Acid elute で得たペプチドは、SepPak C18 3cc (waters) にて精製した。SepPak はアセトニトリル (SIGMA) 3ml で pre-wet したのち、citric phosphate buffer 3ml で平衡化した。さらに、夾雑タンパク質を除くため、amicon ultra YM10 (millipore) による限外濾過膜を用いた精製を行った。

Alkynyl ABC 付加ペプチドの特異的回収法

a. Alexa Fluor® 488 azide による標識とペプチドの回収: 以上のペプチドを 50mM Tris-HCl

pH8.0 に 4mg/ml となるように再溶解し、Alexa Fluor® 488 azide (Life Technologies)と 25°C、2 時間で Huisgen 環化反応を行った。Huisgen 環化反応の組成は Click-iT® Protein Reaction Buffer Kit (Life Technologies) のキットの記載に従った。このときのペプチドの終濃度は 1mg/ml、Alexa 488 の終濃度は 100 μM であり、1L 培養の細胞から回収したペプチドで約 50 μl のスケールで反応させた。この反応で alkynyl ABC 付加ペプチドのみを Huisgen 環化反応によりで標識 (Alexa 488-Alkynyl ABC 付加ペプチド) し、未反応の Alexa 488、内因性ペプチド、Alexa 488-alkynyl ABC 付加ペプチドの混合物を得た。SepPakC18 による精製にて未反応の Alexa 488 はを除去し、内因性ペプチドと Alexa 488-Alkynyl ABC 付加ペプチドを得た。

b. Alexa Fluor® 488 azide 付加ペプチドの特異的回収: 弱陰イオン交換固相抽出カラム Oasis WAX 3cc Vac (waters) により精製し、Alexa 488-alkynyl ABC 付加ペプチドを回収した。

Alkynyl ABC 付加ペプチドの分離

Alexa-AlkynylABC 付加ペプチドを 50% メタノール 60ul に再溶解し、超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) システム (waters) にて分離した。UPLC 条件は、移動相 A: 10mM 酢酸アンモニウム pH7 in milliQ、移動相 B: 10mM 酢酸アンモニウム pH7 in MeOH、Injection vol: 20 μl、カラム: ACQUITY UPLC BEH130 C18 1.7um 2.1x100mm、カラム温度: 40 °C、PDA 検出: 200-280nm、FLR 検出: Em=495nm、Ex=519nm、移動相グラジエントは下の通り行った。

time(min)	流速(ml/min)	A(%)	B(%)
0	0.1	99	1
5	0.1	99	1
10	0.1	80	20
130	0.1	60	40
170	0.1	20	80
172	0.1	1	99
182	0.1	1	99
184	0.1	99	1
190	0.1	99	1

質量分析によるアバカビルとその代謝物の検出

標品が入手可能であった硫酸アバカビル (U. S. Pharmacopeia)、アバカビルカルボン酸 (TRC / Tronto Research Chemicals)、アバカビルグルクロン酸抱合体 (TRC) の質量分析・検出系を構築し、内部標準物質としてトロピセトロンを用いた。UPLC 条件は、移動相 A: milliQ/0.1% 蟻酸、B: アセトニトリル/0.1% 蟻酸にて、下の通り行った。

time(min)	流速(ml/min)	A(%)	B(%)
0	0.3	95	5
1	0.3	95	5
3	0.3	20	80
4.5	0.3	20	80
4.6	0.3	95	5
6	0.3	95	5

また、MS の条件は、下の通り行った。

	parent mass(m/z)	daughter mass(m/z)	cone voltage(eV)	collision energy(eV)
アバカビル	287.27	190.93	26	20
アバカビルカルボン酸	301.26	191.06	26	22
アバカビルグルクロン酸抱合体	463.37	191.04	32	32
トロピセトロン	285.36	124.37	45	22

細胞表面に存在するアバカビルとその代謝物の検出

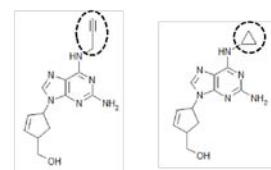
B*5701-C1R、B*5703-C1R、parent C1R アバカビル 30 μg/ml を添加し、15cm シャーレ (培地 30ml) で 24 時間または 48 時間培養した。細胞を PBS 1ml でよく懸濁しながら 15 回洗浄したのち、acid elute 法にて細胞表面に提示されているペプチドを溶出させた。この溶出画分に含まれるアバカビルとその代謝物を LC-MS/MS により定量した。13~15 回目の洗浄画分に含まれるアバカビルの量が検出限界付近でほぼ一定になり、洗浄が十分であることが担保されていることから、Acid elute による溶出画分に含まれているアバカビルは細胞表面のタンパク質の立体構造を変化させたために溶出したものだと考えられる。

4. 研究成果

① Alkynyl ABC 付加ペプチドが HLA-B*5701 特異的に提示されている可能性は低い

1.-1 Alkynyl ABC の合成と反応収率

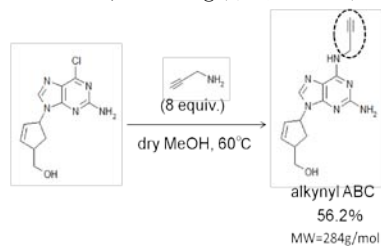
プロテインアダクト由来の薬物付加ペプチドが提示されている可能性を検証するために、HLA-B*5701 発現細胞の表面に提示されているアバカビル付加ペプチドを回収し、質量分析により同定することを計画した。しかし、アバカビルには他の生体内の夾雑物質と明確に分離できるような特徴的な構造が存在しないため、アバカビル付加ペプチドを特異的に回収することは困難であった。そこで、アバカビルのシクロプロパン環をアルキニル基に変換した化合物 (alkynyl ABC) を合成し、アバカビル付加ペプチドの回収に用いることとした。アルキニル基



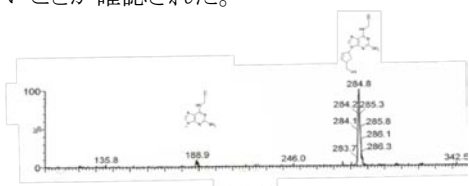
アルキニルアバカビル (alkynyl ABC) アバカビル

は Cu(I) 触媒下でアジド基と反応しトリアゾール環を形成する (Huisgen 環化反応) ことが知られている。アジド基やアルキニル基をもつ内因性物質はほとんど存在しないと考えられるため、夾雑物質の影響が少なく、添加した alkynyl ABC 特異的な反応・回収が可能になると推察された。また、この反応は水中でも効率よく進行することからタンパク質やペプチドに対する修飾物質を取り扱う上で適当であると考えられ、さらに、アバカビルは五員環に結合したアルコール基がアルコールデヒドロゲナーゼによる代謝を受けて活

性化しプロテインアダクトを形成する可能性が報告されており、シクロプロパン環からアルキニル基への誘導体化はプロテインアダクト形成に影響し難いと推測されること、alkynyl ABC の構造や分子量におけるアバカビルとの類似性などを考慮して、alkynyl ABC をアバカビルのモデル化合物として利用することが妥当であると判断した。alkynyl ABC は、アバカビルやその類縁体の合成に関する報告を元に、アバカビル合成前駆体の塩素原子が結合したプリン環の炭素原子に、プロパルギルアミンのアミノ基が求核攻撃する求核置換反応により合成することとした。この反応系には以下の理由から過剰量(8 等量)のプロパルギルアミンを添加した。アミノ基による求核置換反応はアミノ基が非共有電子対をもつ塩基性条件下で効率よく進行すると予想されるが、アバカビル合成前駆体を塩酸塩として反応系に添加することから、反応溶媒を塩基性に傾けるためには塩基としてもプロパルギルアミンが消費されることがためである(上図)。反応の進行は TLC (thin-layer chromatography) (展開溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン=4/1) を用いて確認した。alkynyl ABC の Rf 値は約 0.1、アバカビル合成前駆体の Rf 値は約 0.2 であり、3 時間後には両者がほぼ等量検出された。さらに 9 時間反応を続けたが、それ以上反応の進行が見られなくなったので、原料と生成物(alkynyl ABC)の分離を行うこととし、反応溶液をロータリーエバポレータにて濃縮し、少量のメタノールに再溶解した。これを移動相①酢酸エチル/ヘキサン=17/3、移動相②酢酸エチル、移動相③酢酸エチル/イソプロパノール=19/1 を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより原料と生成物(alkynyl ABC)に分離した。alkynyl ABC を含むと思われるフラクションをロータリーエバポレータにより濃縮し、乾燥重量を測ったところ、112.4mg (収率 56.2%)であった。



得られた産物の分子量を質量分析のポジティブイオンモードで測定したところ、 $m/z=285$ のピークが検出され、alkynylABC の予想分子量 284 と矛盾しないことが確認された。また、原料であるアバカビル合成前駆体(MW=265.7g/mol)由来のピークは検出されなかったことから、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製にも問題ないことが確認された。



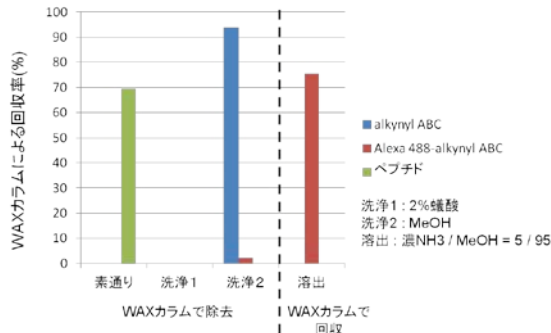
1.-2 Alexa-Alkynyl ABC 付加ペプチドの特異的回収法の妥当性

Alkynyl ABC 付加ペプチドの特異的な回収方法を行った。まず、alkynyl ABC 刺激下で細胞表面に提示されているペプチドを酸性バッファーによる洗浄(acid elute 法)で回収し、内因性のペプチドと alkynyl ABC 付加ペプチドの混合物を得る。この方法は細胞にクエン酸-リン酸バッファーを添加することによりMHC クラスI の立体構造を変性させ、提示されている抗原を溶出させる手法である。次に、Huisgen 環化反応を行い、alkynyl ABC 付加ペプチドを選択的に Alexa Fluor® 488 azide (以下 Alexa 488 と記載する)で標識(Alexa 488-Alkynyl ABC 付加ペプチド)する。その結果、未反応の Alexa 488、内因性ペプチド、Alexa 488-alkynyl ABC 付加ペプチドの混合物を得られると考えられる。この中で、未反応 Alexa 488 は SepPakC18 による固相抽出操作によって除去できることがあらかじめ確認されていたため、SepPakC18 による抽出濃縮を行うこととし、内因性ペプチドと Alexa 488-Alkyl ABC 付加ペプチドを得た。さらにここで、Alexa 488 は分子内に亜硫酸基を 2 ヶ所有する化合物であり、亜硫酸の pKa が 1.9 であることを考慮すると、亜硫酸基は本回収法における条件下では常に負に帯電していると考えられる。そのため、多くのペプチドが陰電荷を失うと考えられる pH3 で弱陰イオン交換固相抽出カラムである Oasis WAX による操作を行うことで、弱酸性物質・中性物質・塩基性物質である内因性ペプチドを除き、強酸性物質である Alexa Fluor® 488 azide 付加物のみを回収することが可能であると考えた。以下、各ステップの妥当性について検討した。

まず、Huisgen 環化反応の反応効率を alkynyl ABC と Alexa 488 の反応を用いて見積もった。以下、Alexa 488 の反応系中の濃度は $100 \mu\text{M}$ で固定した。反応終了後、20 倍希釈して UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) で分析し、Alexa 488-alkynyl ABC の生成量から Huisgen 環化反応の効率を算出した。Alkynyl ABC を $2.5 \mu\text{M}$ 添加した際には反応効率は約 90%、250nM、25nM 添加した際には 25~30%と算出された。反応系にヒト血清アルブミンをトリプシン消化したペプチドを 0、0.01、0.1、1mg/ml 添加した際の反応効率も求めたが、alkynyl ABC を $2.5 \mu\text{M}$ 添加した際には 80-90%、250nM、25nM 添加した際には 30-40%と、ペプチド濃度に依らずほぼ一定であり、ペプチドによる阻害は認められないことが確認された。

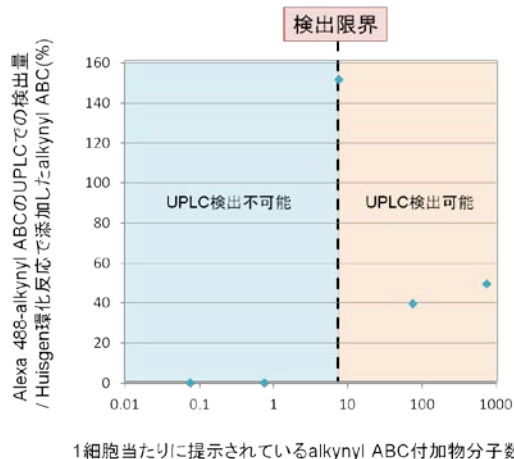
Huisgen 環化反応後のサンプルには、Alexa 488-alkynyl ABC 付加ペプチドに加え、①未反応の Alexa 488、②内因性ペプチド③未反応の alkynyl ABC の 3 種類が主な夾雑物質として存在すると考えられる。まず、ペプチドや alkynyl ABC は逆相系の固相抽出カラムである SepPak C18 に保持されるのに対し、①未反応の Alexa Fluor® 488 azide はカラムに保持されず、SepPak

C18 による精製で大部分 (~99%) を除去できることが確認された。次に、弱陰イオン交換固相抽出カラムである Oasis WAX カラムにより付加物なしの内因性ペプチド ABC は除去され (~100%)、Alexa 488-alkynyl ABC 付加ペプチドを選択性よく回収できることも確認された (下図)。



1.-3 本検討における検出限界の検討

前述したように、alkynyl ABC 刺激下で細胞表面に提示されている alkynyl ABC 付加ペプチドの検出は、①細胞から表面に提示されているペプチドを回収する、②Huisgen 環化反応を行う、③SepPakC18 による精製を行う、④Oasis WAX による精製を行う、⑤UPLC で Alexa-Alkynyl ABC 付加ペプチドを分離・検出する、という一連の操作によって可能になると考えられた。ここで、②Huisgen 環化反応にどの程度の alkynyl ABC 付加ペプチドを添加すれば、⑤UPLC での検出可能であるかの検討を試みた。Alkynyl ABC と alkynyl ABC 付加ペプチドの②~④における回収率に差がないと仮定して、UPLC で検出可能となる、Huisgen 環化反応系へ添加する最小 alkynyl ABC 量を見積もった。Huisgen 環化反応は 50ul のスケールで行い (1L スケールで培養した細胞から回収したペプチドに対して Huisgen 環化反応を行う際とほぼ同等のスケール)、添加した alkynyl ABC の終濃度は 0nM、0.0025nM、0.025nM、0.25nM、2.5nM とした (すなわち、物質として 0fmol、0.125fmol、1.25fmol、12.5fmol、125fmol の alkynyl ABC を添加した)。Huisgen 環化反応から UPLC による検出までの操作は 1-2. alkynyl ABC 付加ペプチド回収法の項で説



明した方法に従って行った。各サンプルを UPLC で分離した結果、Huisgen 環化反応に 12.5fmol 以上の alkynyl ABC を添加したサンプルで Alexa 488-alkynyl ABC 付加物を検出可能であることが明らかとなった (このとき、Huisgen 環化反応溶液に 12.5fmol=7.5x10⁹ 分子の alkynyl ABC を添加している、Fig11)。1L スケールで細胞の培養を行った際には約 1x10⁹ cells を回収できるため、1 細胞当たり 10 分子が提示されていれば、UPLC で検出可能であると算出された。

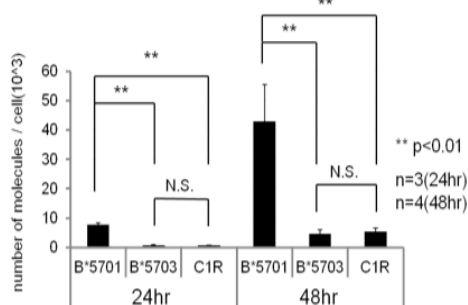
1.-4 B*5701-C1R、B*5703-C1R、parent C1R から回収したペプチドの比較

本検討においては、HLA-B*5701 遺伝子を導入しアバカビル刺激を加えた際に、過敏症発症歴のある患者由来の CD8⁺T 細胞の活性化を誘発することが報告されている C1R 細胞を用いることとした。まず、HLA-B*5701 遺伝子の C 末端に GFP と 6xHis タグを融合したコンストラクトを発現させるベクターを作成した。また、ネガティブコントロールとして HLA-B*5703 (HLA-B*5701 と 2 アミノ酸が異なる HLA 多型であるが、過敏症の発症には関与しないことが報告されている) についても同様のベクターを作成し、方法の項に記した手順にて、HLA-B*5701-GFP-His tag 発現細胞 (B*5701-C1R)、HLA-B*5703-GFP-His tag 発現細胞 (B*5703-C1R) を樹立した。B*5701-C1R、B*5703-C1R、parent C1R をそれぞれ 1L のスケールで alkynyl ABC を添加した条件で培養し、前述の①~④の操作を経て得たペプチドを UPLC により分離・検出し、そのクロマトグラムを比較した (n=3)。それぞれのサンプルにおいて、再現よく検出されるピークをナンバリングし、三者のピーク数を比較した。その結果、B*5701-C1R と B*5703-C1R においては 49 種類のピークが検出され、その中で B*5701-C1R 特異的に検出されるピークは存在しなかった。また、parent C1R においては 40 種類のピークが検出され、それらは B*5701-C1R、B*5703-C1R で検出されたピークと一致した。以上の結果から、HLA-B*5701、HLA-B*5703 に提示される alkynyl ABC 付加ペプチド 9 種類の存在が示唆されたものの、HLA-B*5703 保有者ではアバカビル過敏症を発症しないことを考慮すると、それらはアバカビル過敏症における免疫原性に寄与しないペプチドである可能性が高いと予想された。本検出系では 1 細胞当たり 10 分子の alkynyl ABC 付加ペプチドを検出できること、過剰量の alkynyl ABC を添加して培養していることを考慮すると、検出限界以下の HLA-B*5701 特異的に提示される alkynyl ABC 付加ペプチドは存在しない可能性が高いと考えた。すなわち、アバカビル過敏症においては①のハプテン仮説による薬物付加ペプチドが提示されている可能性は低いと考えられる。

② アバカビルは未変化体として HLA-B*5701 特異的に提示される

上記の検討からアバカビル付加ペプチドが HLA-B*5701 特異的に提示されているとする仮説の可能性は低いと考えられたため、アバカビル(またはその代謝物)単独、もしくは、アバカビルと何らかのペプチドが提示されている可能性が高いと考えた。これらの可能性を検証するために、B*5701-C1R、B*5703-C1R、parent C1R の細胞表面に提示されているアバカビルと主要代謝物(アバカビルカルボン酸、アバカビルグルクロン酸抱合体)の量を比較した。ペプチドの回収は前述した通り acid elute 法を採用し、溶出された化合物の定量は LC-MS/MS により行った。Acid elute を行った細胞数から 1 細胞当たり提示されているアバカビルとその代謝物の分子数を見積もった(次ページ図)。その結果、B*5703-C1R や parent C1R と比較して、B*5701-C1R において有意に多くのアバカビルが未変化体として検出され、24 時間後には約 7,000 分子/cell、48 時間後には約 35,000 分子/cell と算出された。一方で、B*5703-C1R と parent C1R 間には有意差は認められなかった。この時、アバカビルカルボン酸とアバカビルグルクロン酸抱合体はいずれのサンプルにおいても検出されなかった。以上の結果から、可能性②③の中で、HLA-B*5701 特異的に提示されているのはアバカビルの代謝物ではなく未変化体のアバカビルであるケースが示唆された。

1細胞当たりの細胞表面に提示されている
アバカビル未変化体分子数



③ 結論

本研究において、アバカビル過敏症ではプロテインアダクト由来のペプチドではなくアバカビルそのものが HLA-B*5701 特異的に提示されている可能性が示唆された。生体内でアバカビルが未変化体として提示されることが過敏症の原因となるならば、従来のプロテインアダクト量に基づいたスクリーニング系ではアバカビル過敏症のリスク評価は不可能であると考えられる。そこで、特異体質性薬物副作用を予測するスクリーニング系として特定の HLA 多型特異的に薬物(もしくはその代謝物)が提示されるか否かを判別する評価系を追加することで、プロテインアダクト量による評価系単独よりも精度の高い予測が可能になると期待される。

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)

[雑誌論文]

本研究結果を、今後学術雑誌にて発表予定である。

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

該当なし

(3) 連携研究者

本間 雅 (HONMA MASASHI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60401072