

令和元年6月5日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04661

研究課題名（和文）HLA導入マウスを用いた特異体質性肝障害の発症機序解明と前臨床予測法の基盤構築

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of idiosyncratic drug-induced liver injury using HLA-transfected mice for establishment of preclinical prediction method

研究代表者

伊藤 晃成（Ito, Kousei）

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：30323405

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,100,000円

研究成果の概要（和文）：特異体質毒性の中でも肝障害や皮膚過敏症は複数要因が複雑に関わるとされ、メカニズムの解明が遅れていた。本研究では特に動物での再現が困難とされるHLA多型の関わる薬物過敏症に焦点を当て、これを再現可能なマウスを世界で初めて作製した。本マウスにある種の薬物を投与することでヒトで見られるような免疫活性化を介した臓器障害が起こることを確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発症に個人差の大きい特異体質性毒性は、製薬企業、患者の双方にとって厄介な問題で、現時点では医薬品開発途中でそのようなリスクを持つ化合物を見いだすことは困難である。特異体質毒性の発症メカニズム自体が不明であることがその原因の一つであった。本研究によって構築されたHLA多型導入マウスの利用により特異体質毒性の発症メカニズムの解明が飛躍的に進むと期待され、より安全な医薬品開発が行えるようになる点で社会的な意義がある。

研究成果の概要（英文）：Among the idiosyncratic toxicity, liver injury and skin hypersensitivity are considered to be complicated by multiple factors, and the elucidation of the mechanism has been delayed. In this study, we focused on drug hypersensitivity related to HLA polymorphism, which is considered to be difficult to reproduce in animals, and created the mouse model that can reproduce it for the first time. It has been confirmed that administration of certain drugs to this mouse causes organ damage via immune activation as seen in humans.

研究分野：薬物毒性学

キーワード：特異体質毒性 副作用個人差 HLA 薬物過敏症

1. 研究開始当初の背景

特異体質毒性は動物での再現が難しく、かつヒトでも稀にしか起こらないため、前臨床・臨床試験でこれを見いだすことは困難である。市販後に多数の患者に投与されて初めて発覚し、適切な対策も取れないまま市場撤退に追い込まれる医薬品も少なくない。副作用発症の個人差が大きいことが特異体質毒性の最大の特徴である。個人差を決める要因については臨床における後ろ向き解析が中心に行われている。副作用症例が臨床で十分に蓄積した医薬品について遺伝多型の比較解析が行われ、その結果、重篤皮疹や肝障害などの特異体質毒性の発症にはヒトリンパ球抗原 (HLA) 多型が関連することが明らかとなった。これを受け、米国では既に抗てんかん薬カルバマゼピンなどの薬物で投薬前の HLA 多型診断が実臨床で始まっている。また、日本でもこれを追隨する形で類似の前向き臨床研究が進行中である。HLA 多型が特定の薬物の副作用発症と関連するメカニズムについては、1) 薬物あるいはその代謝物が内因性蛋白質と結合して抗原となり、2) HLA 分子により細胞表面へ提示され、3) これを異物として認識する特定の T 細胞が増殖し、4) 抗原提示臓器が障害される、という教科書的なスキームで一応の説明がなされている。しかし、実際にこのスキームが患者体内で成立していることを実証した例はなく、そもそもこのスキームのみで特異体質毒性発症に至るメカニズムの全容を説明しているとは言い難い。HLA 多型の関わる特異体質毒性ではリスク HLA 多型を持つ患者でも発症しないケースも多く見られ、かつ薬物によって毒性を発症する臓器も異なる。例えば、HLA-B*57:01 多型は抗 HIV 薬アバカビル (ABC) による過敏症 (Abacavir hypersensitivity: AHR、主に皮膚、その他、肝臓などの消化器にも症状が出る) のリスクとなることが報告されているが、多型保有者が ABC を服用しても 2 人に 1 人しか発症しない。さらに同多型は抗菌薬 Flucloxacillin による肝障害のリスクとなることも知られるが、多型保有者の 1000 人に 1 人しか発症しない。以上のように、HLA 多型の関わる特異体質毒性の発症には HLA 多型以外の未知要因の関与が無視できず、これを明らかにすることが特異体質毒性の全容の理解、ひいては前臨床、臨床でのリスク回避に繋がると期待される。未知要因を明らかにするには適切な動物モデルを用いた詳細な解析が必要となる。HLA 遺伝子を導入した動物モデルはリウマチ等の自己免疫疾患関連など限られた分野にしか報告がなかったため、まずは適切な動物モデルの作製が必須であった。

2. 研究の目的

ヒト HLA 多型を導入した動物を作出し、ヒトでの特異体質毒性をこの動物で再現する。毒性の発症、進展過程を詳細に調べあげ、どのような免疫細胞群が活性化して組織の傷害に至っているのかを明らかにする。最終的に免疫系の活性化を制御する因子、臓器特異性や傷害の程度を決定する因子の解明に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト HLA 多型導入マウスの作製：本研究では、臨床での遺伝多型解析報告例が多く、かつ HLA と薬物の直接的な結合も実験的に確認されている HLA-B*57:01 多型と抗 HIV 薬 ABC の組み合わせに着目した。ABC による過敏症を再現できる HLA-B*57:01 多型導入マウス、および 2 アミノ酸のみが異なり臨床における ABC 過敏症との関連が報告されていない HLA-B*57:03 多型導入マウスの作製を行い、これらマウスを用い、前半では皮膚での過敏症を、後半では肝障害に焦点をあてて研究を進めることとした。まず、HLA-B*57:01 あるいは HLA-B*57:03 の配列の一部をマウス由来の配列に置き換え、マウス T 細胞受容体との結合が生じ易いように工夫したヒトマウスキメラ型 HLA の配列を設計した。さらに、HLA がマウス細胞内で安定的に発現できるようヒト 2 ミクログロブリンを 2A ペプチドの配列を介してキメラ型 HLA の下流に連結した。全身の細胞に発現するよう pCAGGS ベクターにこれらを挿入した。陰性対照用のベクターも同様に作製した。各ベクターを C57BL/6 マウスの前核期胚へ注入し、トランスジェニックマウス (Tg マウス) を得た。以降の実験では B*57:01-Tg、B*57:03-Tg (陰性対照) およびその同腹仔 (LM) を用いた。

1) 皮膚過敏症の再現と活性化細胞の解析

皮膚塗布：各 Tg マウスを用いて以下の方法で局所リンパ節アッセイを行った。70% DMSO に溶解した ABC 溶液を 25 μ L (0.5 mg/耳) 3 日間連続して片耳の背面に塗布した。もう片方の耳には 70% DMSO のみを同様に塗布した。5 日目にプロモデオキシウリジン (Brd) を腹腔内に投与し、24 時間後に耳介リンパ節を単離した。リンパ節重量を測定後、そこに含まれる細胞を回収し、CD8⁺T 細胞に取り込まれた BrdU⁺、IL-2⁺、および IFN- γ ⁺ の割合を FACS で評価した。また、耳上部の皮膚から切片を作製し、H&E 染色を実施した。

経口投与 and/or 皮膚塗布：各 Tg マウスを 1% (w/w) ABC 混餌+耳への ABC 塗布 (0.5 mg/耳) の群と通常食群を設けた。一部のマウスについては抗マウス CD4 モノクローナル抗体を腹腔内投与し、CD4⁺T 細胞を枯渇した条件でも検討を行った。

2) 肝障害の再現：各 Tg マウスに ABC を 1% (w/w)ABC 混餌投与した。一部のマウスには 0,2,4 日目に CpG-ODN (1826, type B (以下 ODN)) を 40 µg/マウスで腹腔内投与した。最長で 4 週間まで経日的に採血し、肝障害マーカー ALT を測定した。肝組織切片を作製し、リンパ球の染色を行った。肝臓から単球を単離し、リンパ球の組成および活性化について CD3, CD4, CD8, CD44, CD62L, CD69, CD279 (PD-1)の抗体を用いて FACS で評価した。

4. 研究成果

1) ABC による皮膚過敏症の再現と活性化細胞の解析

皮膚塗布：B*57:01-Tg では、未処置の左耳と比べて ABC 塗布した右耳のリンパ節重量および BrdU 取り込み量ともに有意に増加した。一方、B*57:01-Tg の両耳に DMSO のみを塗布した群ではそのような増加は認められなかった。同様に LM および B*57:03-Tg に ABC 塗布を行っても有意な上昇は認められなかった。特にどのような細胞で BrdU 取り込みが増加しているかを調べたところ、CD4⁺T では変化なく、CD8⁺T で有意な増加が確認された。さらに、ABC 塗布後の各マウスのリンパ節から単離したリンパ球を *in vitro* で培養し、そこに ABC を曝露し、再活性化が起こるか調べた。すると、先の BrdU 取り込みの結果と同様、B*57:01-Tg マウスに ABC を塗布したマウスから単離した細胞に ABC を曝露したときに限って、CD8⁺T 細胞で IL2, IFN などのサイトカイン産生が増加した。耳上部の皮膚組織像を観察したところ、B*57:01-Tg に ABC を塗布した群において他に比べてより顕著なリンパ球浸潤を認めた。以上、B*57:01-Tg では ABC に対する特異的な獲得免疫活性化が見られ、中でも CD8⁺T 細胞が特に活性化されていることなど、臨床での ABC 過敏症に近い状態を再現できることが確認された。

経口投与 and/or 皮膚塗布：Tg マウスに ABC を 2 週間に渡り混餌投与したところ、B*57:01-Tg では B*57:03-Tg と比較して、リンパ節および脾臓の両方でメモリー CD8⁺T 細胞が有意に増加した。この現象は ABC と同効薬で HLA-B*57:01 との副作用関連報告のない他のヌクレオチド類似体 (アシクロビルおよびジドブジン) を投与した際には観察されなかったことから、本 Tg マウスでは HLA 多型と薬物の組み合わせによる獲得免疫の特異的な活性化を再現できていることが確認された。B*57:01-Tg では 1,2 週間と ABC の投与を継続していくにつれてメモリー CD8⁺T 細胞が増加していく様子が見られたが、皮膚での過敏症様症状は認められなかった。つい最近、別のグループからの報告で同様の HLA-Tg マウスに ABC を投与して皮膚過敏症を再現した報告がなされ、そこでは CD4 を予め中和抗体で除去することが重要と記されていた。CD4⁺T 細胞の中には免疫を抑制するタイプも含まれ、その作用の抑制が CD8⁺T 細胞の活性化とその後の皮膚への浸潤や組織傷害に重要である可能性が考えられる。そこで我々のマウスでも同様に CD4⁺T 細胞に対する中和抗体を併用する条件で ABC の投与を 3 週間まで実施した。すると、先に見られていた ABC 投与によるリンパ節でのメモリー CD8⁺T 細胞の上昇が CD4⁺T 細胞の除去によりさらに増強した。これに伴い ABC 単独投与では見られなかった耳の腫れ、皮膚組織へのリンパ球浸潤、特に CD8⁺T 細胞の浸潤が B*57:01-Tg で認められるようになった。一連の現象は陰性対照の B*57:03-Tg では見られなかった。

2) ABC による肝障害の再現と活性化細胞の解析

各 Tg マウスおよび LM に ABC を 4 週間まで連日経口投与したが、肝障害マーカーである ALT の上昇は見られなかった。HLA-B*57:01 の多型のみでは ABC による肝障害発症に不十分だったものと考えられた。一方、獲得免疫の活性化には自然免疫の補助も重要であることが知られる。そこで、自然免疫の活性化に重要な Toll 様受容体 (TLR) の一つである TLR9 に着目し、そのリガンドの ODN と ABC との併用を試みた。その結果、ODN、ABC それぞれ単独投与では 2 週間目までいずれのマウスでも ALT の上昇は見られないものの、併用時には B*57:01-Tg マウスでのみ ALT の有意な上昇を認めた。興味深いことにこの上昇は一過性で、ABC 投与を継続しても 1 週目前後をピークに減少して 2 週目でほぼ正常値まで低下した。ALT がピークとなる 1 週目時点で肝切片を作製し、組織像の観察と免疫細胞の染色を行った。その結果、B*57:01-Tg に ODN と ABC を併用した際にのみ肝組織の傷害を認め、CD8⁺T 細胞が特に肝組織に浸潤する様子が観察された。一方、CD4⁺T 細胞の浸潤はほとんど認められなかった。同じタイミングで肝臓の単核球を単離し、リンパ球の活性化の状態を FACS により調べた。その結果、組織免疫の結果と同様に CD8⁺T 細胞の特異的な活性化が確認された。さらに興味深いことに、B*57:01-Tg に ABC と ODN を併用した群では、ABC 投与開始 1 週間の時点で寛容マーカーである PD-1 を発現する CD8⁺T 細胞の割合が有意に上昇することも確認された。以上の結果から、B*57:01-Tg マウスに ABC を単独で投与しても肝障害が認められなかった理由としては、ODN のような TLR リガンドへの共刺激が不足していたことが考えられた。一方で、ODN の併用により CD8⁺T 細胞の特異的な活性化と肝細胞への攻撃が生じた場合も、これら免疫系の過剰な活性化を抑制するために寛容系が速やかに誘導され、これにより傷害が一過性に留まったものと考えられた。

まとめ：本研究では HLA-B*57:01 多型の関わるヒトでの特異体質毒性を再現可能な世界初の動物モデルの確立に成功した。特に ABC による皮膚と肝臓に着目し、各臓器での毒性発症に必要な要因、条件を探索し、毒性発症、増悪の過程で特異的に活性化する免疫細胞、およびその

特性を調べた。その結果、HLA 多型というリスク要因に加え、CD4 の数、自然免疫の活性化、寛容系の活性化など、CD8⁺T 細胞の初期活性化と持続的な活性化に関わる因子の重要性が示された。今回は発症臓器の特異性を決める要因の解明までは至らなかったが、本動物モデルを今後引き続き詳細に調べていくことで特異体質毒性の発症メカニズムの全容解明に繋がるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- 1) Song B, Aoki S, Liu C, Susukida T, Ito K. An animal model of abacavir-induced HLA-mediated liver injury. *Toxicol Sci.* 162(2):713-723. (2018) 査読有 (doi:10.1093/toxsci/kfy001)
- 2) Susukida T, Aoki S, Kogo K, Fujimori S, Song B, Liu C, Sekine S, Ito K. Evaluation of immune-mediated idiosyncratic drug toxicity using chimeric HLA transgenic mice. *Arch Toxicol.* 92(3):1177-1188. (2017) 査読有 (doi:10.1007/s00204-017-2112-9)
- 3) Ito K & Kobayashi K. Prediction of the potential risk of idiosyncratic drug toxicity. *Drug Metab Pharmacokinet* 32(1):1. (2017) 査読有 (doi:10.1016/j.dmpk.2016.12.002)
- 4) 伊藤晃成, 青木重樹, 薄田健史, 副作用の個人差を動物で再現 - HLA 導入マウスの開発 *Academist Journal* 研究コラム, 2017/12/26 査読無

〔学会発表〕(計 32 件)

- 1) 薄田健史, 青木重樹, 伊藤晃成: HLA 遺伝子導入マウスを用いた高感度な特異体質薬物皮膚毒性評価モデル, 第 139 年会 日本薬学会, 2019
- 2) Binbin Song, Shigeki Aoki, Akinori Takemura, Yuying Gao, Kousei Ito: Toll-like receptor 9 agonist sensitizes mice to flucloxacillin induced acute liver injury, International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX (Symposium), 2018
- 3) Kenji Watanabe, Shigeki Aoki, Takahiro Goto, Liang Qu, Tyuji Hoshino, Kousei Ito: In silico structural analysis of HLA complexes associated with idiosyncratic drug toxicities, International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX (Symposium), 2018
- 4) 白柳智弘, 青木重樹, 間哲生, 平沢真, 伊藤晃成: ファージディスプレイ法を利用した HLA 多型の関与する薬物毒性の予測法の提案, 第 25 回日本免疫毒性学会学術年会, 2018
- 5) 伊藤晃成: 特異体質毒性～予測法開発のためのメカニズム研究, 安全性評価研究会 2018 年夏のフォーラム(招待講演), 2018
- 6) 藤森惣大, 青木重樹, 薄田健史, 伊藤晃成: HLA 遺伝子導入マウスを用いた皮膚特異的な薬物毒性メカニズムの解析, 第 32 回 日本薬物動態学会年会, 2017
- 7) 宋彬彬, 青木重樹, 劉聡, 薄田健史, 向後晃太郎, 伊藤晃成: HLA の関与したアバカビルによる肝障害動物モデルの構築, 第 32 回 日本薬物動態学会年会, 2017
- 8) 薄田健史, 青木重樹, 藤森惣大, 向後晃太郎, 伊藤晃成: Evaluation of the immune-mediated idiosyncratic drug toxicity using chimeric HLA transgenic mice, 第 31 回日本薬物動態学会年会, 2016
- 9) 藤森惣大, 青木重樹, 伊藤晃成: Analysis of mechanism of idiosyncratic adverse drug reactions using HLA-Tg mice-derived keratinocytes, 第 31 回 日本薬物動態学会年会, 2016
- 10) 藤森惣大, 青木重樹, 向後晃太郎, 劉聡, 関根秀一, 伊藤晃成: キメラ型 HLA 遺伝子導入マウスを用いた細胞性免疫による特異体質薬物毒性の発現メカニズム解明, 第 88 回日本分子生物学会年会 日本生化学会大会 合同大会, 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: HLA 導入細胞を用いた特異体質薬物毒性の予測方法

発明者: 青木重樹、藤森惣大、宋彬彬、伊藤晃成

権利者:

種類:

番号: 特願 2016-169161

出願年: 2016

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/yakuzai/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：青木 重樹

ローマ字氏名：Aoki Shigeki

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院薬学研究院

職名：助教

研究者番号(8桁): 30728366

(2)研究協力者

研究協力者氏名：薄田 健史、宋 彬彬、藤森 惣大、向後 晃太郎

ローマ字氏名：Susukida Takeshi、Song Binbin、Fujimori Sota、Kogo Kotaro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。