

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14995

研究課題名(和文) アバカビル重症薬疹を再現可能なヒト化モデル動物を利用した発症メカニズム解明

研究課題名(英文) Elucidation of the onset mechanism of abacavir-induced severe skin reaction using humanized model animal

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：HLA多型の関わる特異体質毒性を動物で再現するのは困難である。今回、HLA-B*57:01多型保有者でのアバカビル(ABC)皮疹を再現するため、同多型および陰性対照の*57:03多型を導入したマウスを作製し、皮膚にABC塗布して反応を調べた。その結果、B*57:01マウスでのみABC選択的な反応を認め、別個に両新生児マウスの皮膚細胞を単離してABC曝露した際は、IL-1などの炎症性サイトカインがB:57:01マウス由来でのみ誘導されることを確認した。以上、HLA多型の関わる特異体質毒性を動物で初めて再現するとともに、臓器特異的毒性発現にHLA多型依存的な細胞初期応答が関わる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：There was no suitable animal model to reproduce the idiosyncratic toxicity related to HLA polymorphism. In order to reproduce the rash caused by abacavir (ABC) seen in HLA-B*57:01 polymorphic carriers, mice introduced with HLA-B*57:01 or its negative control (HLA-B*57:03 polymorphism) were prepared. ABC was applied to their skin in vivo or to their primary cultured keratinocytes in vitro to investigate specific immune response. As a result, increase in lymph node weight in vivo and acute induction of inflammatory cytokines in vitro were selectively observed only in B*57:01 mice group. Idiosyncratic immune response related to HLA polymorphism was reproduced for the first time in our transgenic mice model, and the possibility that HLA polymorphism-dependent acute cellular response might be involved in tissue-specific drug toxicity.

研究分野：医薬品安全性学

キーワード：HLA 特異体質毒性

1. 研究開始当初の背景

薬の副作用は中毒性と特異体質性に大別される。前者は動物で再現可能なため、前臨床段階で見いだすことが比較的容易である。一方、後者は動物で再現困難なため、前臨床段階で見逃される可能性が高く、臨床試験あるいは市販後に発覚して問題となることが多い。中でも薬疹は代表的な特異体質性副作用で、スティーブンスジョンソン症候群(SJS)や中毒性表皮壊死症(TEN)など致命的転帰を辿る可能性があるため、特に問題視されている。近年のゲノムワイド関連解析(GWAS)の発展により、薬疹などの特異体質毒性にヒトリンパ球抗原(HLA)多型が関連することが分かってきた(Daly, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012)。例えば、抗HIV薬アバカビル(ABC)による薬疹は、HLA-B*57:01多型保有者で非保有に比べ100~1000倍高まることが示され(Pavlos et al., *Pharmacogenomics*, 2012)、欧米では既に投薬前の多型診断も始まっている(Amstutz et al., *Epilepsia*, 2014)。また国内では、抗てんかん薬カルバマゼピンによる重症皮疹とHLA-A*31:01との関連報告を受け、前向き臨床試験が進行中である(Kaniwa et al., *Pharmacogenomics*, 2013)。このようにHLA多型と特異体質毒性の関連を示す臨床報告は現在も増えつつあるが、未だ相関止まりである。最近になり、HLA-B*57:01によるABCの抗原提示の様式が、従来のハプテン仮説(薬物がペプチドに結合して抗原提示される)と異なり、薬物がHLAに結合することで提示されるペプチド種類が変わる、いわゆるp-i(pharmaco-immune)仮説が提唱されて大きな注目を集めたが(illing et al., *Nature*, 2012)、皮膚特異的障害を生じる分子メカニズムはやはり不明なままである。

2. 研究の目的

臓器特異的障害のメカニズムを解明する

には、HLAの関わる特異体質毒性を再現する動物モデルが必要である。申請者らは最近、HLA-B*57:01を全身に発現するトランスジェニックマウス(Tgマウス)作出に成功しているため、このマウスを用いてABCによる皮膚特異的な障害発生機序の解明を試みた。

3. 研究の方法

実験動物の飼育と遺伝子型の判定

マウスの維持及び繁殖は、千葉大学薬学部内の実験動物飼育室において行い、千葉大学動物実験委員会の承認の下、実施した。遺伝子型の判定については、抽出したゲノムに対して、Go Taq Green Master Mix (Promega)と導入キメラ型HLA遺伝子の一部を増幅可能な以下のプライマーセットを用いて半定量的PCR反応を行い、3%アガロースゲル電気泳動結果を基に判定した。HLA forward 5'-GAG CTA CTC TCA GGC TGC GTG-3' and reverse 5'-CAT GTT AGC AGA CTT CCT CTG CC-3'。

マウス末梢血単球(PBMC)の単離

8~12週齢のキメラ型HLA-B*57:01及びB*57:03遺伝子導入マウス(B*57:01-Tg及びB*57:03-Tg)、及び同腹子である野生型のリッターメートの頸静脈より末梢血を採取し、HBSSと1:1で混合した。次にHistopaque®-1083(Sigma)に上層し、密度勾配遠心(400×gで30分間)により末梢血単球(PBMC)画分を回収した。さらに250×gで10分間遠心し、上清を除去した後にPBSで細胞ペレットを懸濁したものを試験に供した。

初代ケラチノサイト(KC)の単離と培養

1~3日齢のB*57:01-TgまたはB*57:03-Tg、及びそれぞれのリッターメートの新生児の皮膚を剥離した後、CnT-PR培地(CELLnTEC)で調製した5mg/mLのディスパーゼ(合同酒精)溶液中で、4℃において16~18時間インキュベーション

ョンを行った。次に、CnT-PR 培地で皮膚切片を洗い、真皮から表皮を剥離した後、アキユターゼ溶液（ナカライテスク）にて室温で 30 分間インキュベーションを行った。そこで表皮からケラチノサイトを分離させ、CnT-PR 培地で 2 回洗い、遠心チューブに回収した。200 × g で 5 分間遠心し、上清を除去した後に CnT-PR 培地で細胞ペレットを懸濁し、 7.5×10^4 cells/cm² となるように播種した。培養プレートには予めコラーゲン（Corning）をコートした。細胞は 37°C、5% CO₂ の条件下で培養を行い、24 時間後に培養液を交換した後にさらに 3 日間培養したものを試験に供した。

導入 HLA タンパク質の細胞表面量評価

精製した PBMC に対して、以下の抗体を用いて染色した：PE anti-human HLA-A,B,C Antibody（W6/32, 1:100, SONY）、FITC anti-mouse CD11c antibody（N418, 1:100, TONBO）。抗 CD11c 抗体は PBMC 中の樹状細胞を特定する目的で使用した。PBMC と抗体を室温で 15 分間インキュベーションし、フローサイトメーター（セルアナライザー EC800、SONY）を用いて、蛍光強度から細胞表面 HLA 発現量を測定した。解析には、付属のソフトウェアを用いた。

局所リンパ節増殖試験（LLNA）

皮膚感作性試験の 1 つである局所リンパ節増殖試験（LLNA）の方法については、OECD テストガイドライン 442B（OECD Guideline for Testing of Chemicals, 442B : Skin Sensitization : Local Lymph Node Assay : BrdU-ELISA）に準拠した。遺伝子型が未判定である 8~12 週齢のマウスに対して、アバカビル ABC 溶液（20 mg/mL in 70% DMSO）もしくは対照溶媒を 1 日おきに右耳の付け根付近に 25 μ L 塗布し、対照として左耳を未処置とした。3 回目の塗布から 2 日後に Bromodeoxyuridine（BrdU; 5 mL/body、東京化成工業）を腹腔内投与し、その 24 時間

後に両耳の耳介リンパ節を別々に回収した。初めにリンパ節重量を計量し、続けて生理食塩水中で 100 μ m 径のセルストレイナーを用いて濾過した。さらに生理食塩水で 15 倍希釈したものを 96 穴プレートに移し、BrdU 取り込み量の測定に供した。BrdU 取り込み量は ELISA キット（Cyclex）を用いて測定し、最終的に左右比（右耳での値を左耳での値で除した）を個体ごとに算出した。本試験は単盲検で行い、全行程終了後に既述したとおり導入 HLA 遺伝子型の判定を実施した。

また、LLNA 法の陽性対照として、アセトン/オリーブオイル 4:1 中に溶解させた 1% 1-Chloro-2,4-Dinitrochlorobenzene（東京化成工業）を塗布し、同様にリンパ節重量及び BrdU 取り込みの評価を行った。

KC に対する薬物曝露応答の評価

B*57:01-Tg とそのリッターメート由来の KC を、最終濃度が 0、10、100、500 μ M となるようにアバカビル（ABC、Carbosynth）を加え、CnT-PR-D 培地（CELLnTEC）に置換して 12 時間培養した。培養液を除去した後に細胞から Sepazol-RNA I Super G（ナカライテスク）を用いてトータル RNA を回収し、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix（東洋紡）を用いて逆転写を行い cDNA を得た。作製した cDNA に対して、Thunder Bird SYBR qPCR Mix（東洋紡）と下記の各プライマーセットを用いて、LightCycler-Nano（Roche）により定量的リアルタイム PCR 反応を行った。各 mRNA の発現量は、ハウスキープ遺伝子である β -actin の mRNA 発現量で補正した後に、アバカビルを添加していないサンプルの mRNA 発現量で除した相対値で示しており、データは 3 試料の平均値 ± 標準偏差で表した。用いたプライマーは次のとおり：IL-1 β forward 5'-TCG CTC AGG GTC ACA AGA AA-3' and reverse 5'-CAT CAG AGG CAA GGA GGA AAA C-3'、IFN- γ forward 5'- AGG TCC AGC

GCC AAG CAT TCA A-3' and reverse 5'-AGC AGC GAC TCC TTT TCC GCT T-3', KRT16 forward 5'- ATG ACC GCC TGG CCA CCT ACC TGG AC-3' and reverse 5'-CCC TCC ACG GAC TGC CGC AAG AA-3', β -actin forward 5'- TTC AAC ACC CCA GCC ATG TAC G-3' and reverse 5'- GTG GTG AAG CTG TAG CC-3'.

4. 研究成果

1) Tg マウスの各種細胞における HLA の膜表面発現確認

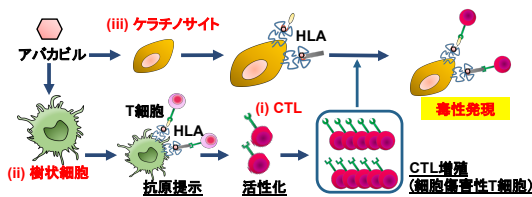


図1 HLA多型の関わる毒性発現で想定される一般的なスキーム

図1には、一般的に想定されている薬物による HLA 多型依存的な適応免疫の活性化とそれに引き続く皮膚障害発症のスキームを示す。HLAを導入した Tg マウスにおいては、少なくともこのスキームに含まれる細胞群の膜表面に外来性の HLA が発現することが必要と考えられる。そこでまず、HLA-B*57:01 及び陰性対照の B*57:03 のトランスジェニックマウス (B*57:01-Tg、B*57:03-Tg) より各種細胞を単離し、膜表面での HLA 発現をフローサイトメトリーにより調べた (図2)。

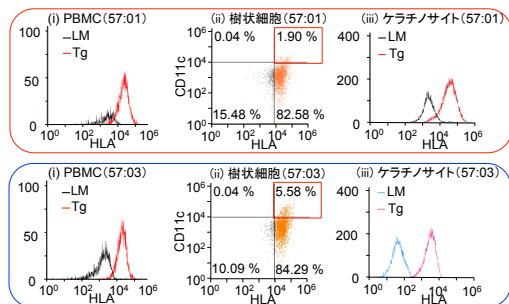


図2 PBMC・樹状細胞・クラチノサイトにおける導入キメラ型HLAタンパクの細胞表面の発現比較 (PBMC: 末梢血単球, LM: リッターメート, Tg: トランスジェニックマウス)

末梢血単球ならびにそこに含まれる樹状細胞 (CD11c 陽性画分) における、外来性 HLA

の細胞膜表面発現量は両 Tg マウスで同等であった。また、新生児マウスより単離培養した初代ケラチノサイトにおける HLA 発現も各リッターメート (LM) に対するシグナル比として同等であった。以上より、少なくとも両 Tg マウスでは抗原の感作、提示、細胞障害の一連の過程に関わる細胞群で同程度の HLA 細胞表面を認めたことから、これら Tg マウスは ABC による HLA 依存的な特異体質性の皮疹を再現するための最低条件は備わっていると考えられた。

2) ABC を用いた局所リンパ節増殖試験

次に、本 Tg マウスで ABC 曝露による免疫感作が HLA-B*57:01 特異的に生じ得るかについて、前臨床での皮膚感作性試験として一般的に行われる LLNA 法を用いて検討した。

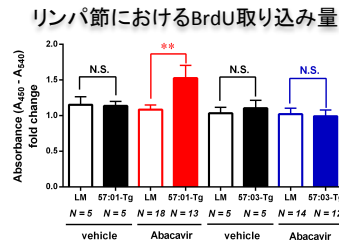
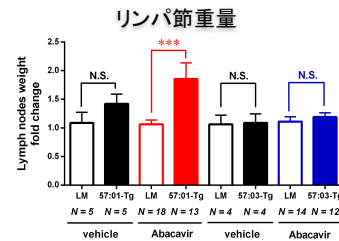


図3A ABC溶液を塗布した際のLLNAの反応性 The mean \pm S.E.M. **p < 0.01, ***p < 0.001; N.S. represents Not Significant

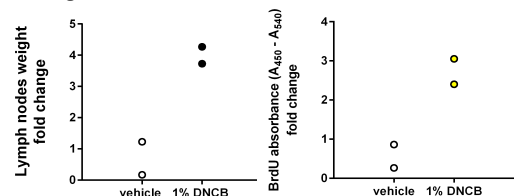


図3B 陽性対照として1%DNCBを塗布した際のLLNAの反応性 (n=2)

ABC 溶液もしくは対照溶媒 (vehicle) を 1 日おきに右耳の付け根付近に塗布し、対照として左耳を未処置とした。3 回目の塗布から 2 日後に BrdU を腹腔内投与し、さらにその 24 時間後に両耳の耳介リンパ節を別々に回

収した。リンパ節重量ならびに BrdU 取り込み量の左右比を個体ごとに算出した。その結果、耳介リンパ節重量、ならびに、そこに取り込まれた BrdU 量は B*57:01-Tg においてリッターメートに比べて有意に増加した (図 3A)。一方、B*57:03-Tg においてはリッターメートと有意差を認めなかった。なお、陽性対照である DNCB 溶液を野生型マウスに適用した際には、リンパ節重量比、BrdU 取り込み量は、vehicle 塗布群に比べてそれぞれ 3~4 倍、2~3 倍に上昇することも併せて確認している (図 3B)。

3) ABC 曝露に対する各 Tg マウス初代ケラチノサイト (KC) の反応性比較

Tg マウスの新生児より単離した KC を分化させ、そこに ABC を曝露したところ、12 時間前後で B*57:01-Tg でのみ IL-1 β と IFN- γ などの炎症性サイトカイン、ならびに KC 活性化マーカーである KRT16 の mRNA 上昇が認められた (図 4)。一方、陰性対照である B*57:03-Tg マウスの KC ではこれら上昇が認められなかった (data not shown)。

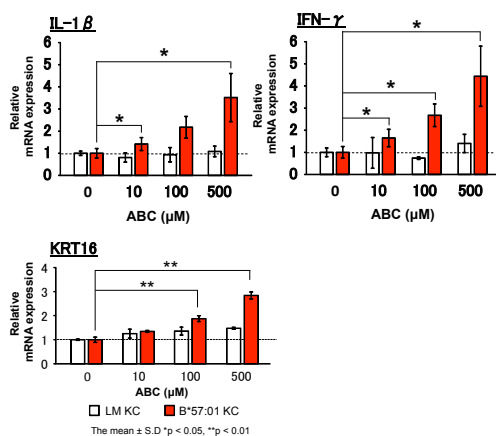


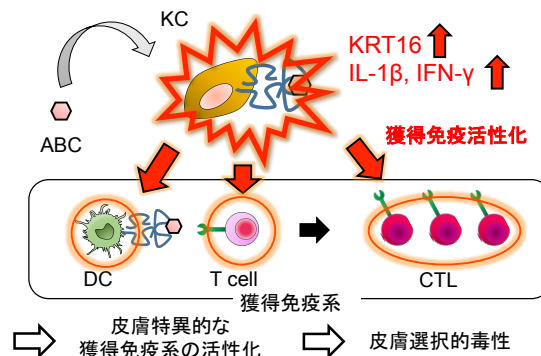
図4 ABC曝露時のB*57:01 KCにおける各種mRNA発現評価

B*57:01-Tg マウスの KC で認められた mRNA 上昇は ABC 濃度依存的かつ、用いた ABC 濃度の範囲 (0-500 μ M) では LDH 漏出がほとんど観察されなかったことから、細胞死による二次的影響の可能性は低いと考えられた。また、一連の反応は ABC と同じ核酸アナログに分類されるジドブジンやアシクロビル曝露時には観察されなかった

(data not shown)。さらに、ヒト皮膚由来の不死化細胞である HaCaT 細胞、ならびに子宮頸癌細胞由来の HeLa 細胞に HLA-B*57:01 を一過性発現させた状態に ABC 曝露をした際も上記の炎症性サイトカインの誘導は認められなかった (data not shown)。

4) まとめ

HLA-Tg マウスでは、HLA 多型に依存した ABC 特異的な免疫活性化を再現することができた。初代 KC の単独培養に ABC を曝露するだけで HLA-B*57:01 特異的、かつ ABC 特異的な反応を認めたことから、樹状細胞上の HLA を介した抗原提示が T 細胞活性化を引き起こす、いわゆる一般的な適応免疫のスキームのみでは説明できないと考えられた。詳細なメカニズムは現時点で不明だが、ABC に対する HLA-B*57:01 依存的な KC 単独での初期反応性の違いが臓器特異的な皮膚障害発現に関わっている、というこれまで想定されたことのない新たなスキームの提唱に至った。



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 8件)

1) 青木重樹, 向後晃太郎, 聡劉, 藤森惣大, 関根秀一 & 伊藤晃成 (2015年6月29日~7月1日). キメラ型 HLA 遺伝子導入マウスを活用した免疫系の関与する特異体質薬物毒性発症機能の理解. 第42回日本薬物毒性学

会年会. 石川県立音楽堂 (石川県金沢市)

2) 藤森惣大, 青木重樹, 向後晃太郎, 聡劉, 関根秀一 & 伊藤晃成 (2015年12月1日~12月4日). 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38回、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. 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

3) 薄田健史, 青木重樹, 藤森惣大, 向後晃太郎 & 伊藤晃成 (2016年9月5日~9月7日). キメラ型 HLA 遺伝子導入マウスを用いた免疫の関与する特異体質毒性評価モデルの構築. 第23回日本免疫毒性学会学術年会. 北九州国際会議場 (福岡県北九州市)

4) 藤森惣大, 青木重樹, 薄田健史 & 伊藤晃成 (2016年9月5日~9月7日). HLA 遺伝子導入マウス由来ケラチノサイトを用いた特異体質薬物毒性メカニズムの解析. 第23回日本免疫毒性学会学術年会. 北九州国際会議場 (福岡県北九州市)

5) 薄田健史, 青木重樹, 藤森惣大, 向後晃太郎 & 伊藤晃成 (2016年10月13日~10月15日). 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. キッセイ文化ホール (長野県松本市)

6) 藤森惣大, 青木重樹 & 伊藤晃成 (2016年10月13日~10月15日). 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. キッセイ文化ホール (長野県松本市)

7) 薄田健史, 青木重樹, 藤森惣大, 向後晃太郎 & 伊藤晃成 (2016年10月21日~22月15日). 免疫の関与する特異体質薬物毒性の評価におけるキメラ型 HLA 遺伝子導入マウスの有用性. 第1回黒潮カンファレンス. サンライズ九十九里 (千葉県山武郡九十九里町)

8) 藤森惣大, 青木重樹 & 伊藤晃成 (2016年10月21日~22月15日). HLA 遺伝子導入マウス由来ケラチノサイトを用いた皮膚選択的な特異体質薬物毒性の発症メカニズムの解析. 第1回黒潮カンファレンス. サンライズ九十九里 (千葉県山武郡九十九里町)

[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

発明者: 青木重樹、藤森惣大、宋彬彬、伊藤晃成

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2016-169161

出願年月日: 2016年8月31日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

関根 秀一 (Sekine Shuichi)

千葉大学・大学院薬学研究院・講師

研究者番号: 70401007

青木 重樹 (Aoki Shigeki)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号: 30728366