

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 17 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19168

研究課題名(和文) 官能基非依存性固定化ビーズを用いた重症薬疹の初期発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study for mechanisms of drug-induced severe cutaneous reactions

研究代表者

岡本 好海(内田)(Okamoto-Uchida, Yoshimi)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・任期付研究員

研究者番号：40716792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：スティーブンスジョンソン症候群・中毒性壊死症(Stevens-Johnson Syndrome/ Toxic Epidermal Necrolysis: SJS/TEN)は、免疫系が関与する特異体質性の重篤副作用である。近年、原因薬毎にSJS/TEN発症に関連するヒト白血球抗原(HLA)型が存在することが明らかとなってきた。本研究では、複数の分子間相互作用解析系を検討し、医薬品とHLAタンパク質との分子間相互作用解析法を確立した。本研究成果は、副作用発症予測系の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have revealed that the prevalence of Stevens-Johnson Syndrome/ Toxic Epidermal Necrolysis (SJS/TEN) is associated with genetic backgrounds, such as polymorphisms in human leukocyte antigens (HLAs). However, molecular mechanism involved in the SJS/TEN onset has been largely unknown. In this project, we developed a system for determination of affinity between drug and HLA protein. This system would be useful for estimation of drug adverse reactions.

研究分野：医療系薬学

キーワード：スティーブンス・ジョンソン症候群 中毒性表皮壊死症 HLA 医薬品 分子間相互作用

1. 研究開始当初の背景

SJS 及びその進展型である TEN は、皮膚粘膜症状を主症状とする重篤な副作用であり、常に医薬品医療機器総合機構 (PMDA) による被害救済例の最上位にランクされる。発症頻度は低いものの、致死率は SJS では 5%、TEN では 30% と高い。さらに回復しても目や呼吸器に後遺症が残る場合が多く、重篤副作用の中でも特に問題となっている。SJS/TEN の発症には医薬品に対する免疫・アレルギー反応の関与が強く示唆されているが、いまだ発症機構は不明な点が多い。広範囲に亘る医薬品が原因となることが SJS/TEN の特徴であり、新しい抗てんかん薬や抗ウイルス剤の例の様に今後も発生件数の増加が見込まれるため、その発症機構の解明及び医薬品開発段階での副作用予測、投薬前診断法の開発等が重要な課題となっている。

近年、SJS/TEN 発症とヒト白血球抗原 (HLA) の特定遺伝子型との相関が、当研究室を含む複数のグループから報告されている。特にカルバマゼピン及びアロプリノールについてはそれぞれ HLA-B*15:02・B*15:11 及び HLA-B*58:01 との強い関連が明らかになっており、その発症機序として、それぞれ原薬及び代謝物が、関連する HLA 型分子と特異的に結合し、細胞障害性 T 細胞や NK 細胞を活性化することが示されている。既に米国や台湾、シンガポールでは、投与前診断として HLA 検査が添付文書中にて推奨または義務化されている。

一方で、これらの関連には薬剤特異性と民族特異性があることも明らかになっている。当研究室では、日本人 SJS/TEN 患者検体を集積し遺伝子多型解析を行い、複数の日本人特異的なリスク HLA アリルを見出してきた。最近では、アセトアミノフェン誘因性 SJS/TEN の発症が、HLA-A*02:06 及び HLA-B*44:03 と関連することを報告

した (Sci Rep, 2014)。しかしながら、これらの HLA 型と相互作用する医薬品が原薬か代謝物か、その相互作用の強さと薬物濃度との関連等の初期発症機序については不明なままである。

2. 研究の目的

HLA と医薬品の分子間相互作用解析法を確立し、副作用発症予測系の開発に繋げることを本研究の目的とした。特に、アセトアミノフェン誘発性 SJS/TEN 等は HLA-A*02:06 や HLA-B*44:03 と関連することを見出してきたが、未だアセトアミノフェンと関連 HLA タンパク質が直接結合するのか否かは明らかとなっていない。これらの医薬品と関連する HLA 分子との親和性を明らかにし、薬物の血中濃度との関連性を考察することを試みた。

また、当部で収集した SJS/TEN 症例を解析することで、SJS/TEN の重症化に関連する因子を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 薬剤結合ビーズを用いた相互作用解析
官能基非依存性固定化ビーズは表面に光依存的に多様な官能基と共有結合を形成するジアジリン基をコーティングしたビーズである。医薬品を光依存的にランダムな方向性でビーズ表面に固定化することができるため、医薬品の様々な構造に対する結合能を一度に検討することが可能である。アセトアミノフェンを結合させた官能基非依存性固定化ビーズと精製 HLA-A*02:06 タンパク質を用いて結合能を検討した。ビーズと共に共沈降したタンパク質の量をウェスタンブロット法により検出した。ネガティブコントロールとして HLA-A*02:01 タンパク質を用いた。

2) 放射線ラベルした薬物を用いた相互作用解析

精製 HLA-A*02:06 タンパク質またはネガティブコントロールである HLA-A*02:01 タンパク質をビオチン-ストレプトアビジン反応によって磁気ビーズに固定化した。放射線ラベルしたアセトアミノフェンをこれらの HLA 結合ビーズと反応させ、緩衝液で洗浄後、共沈降した医薬品の量を、液体シンチレーションカウンターにより測定した。

3) バイオレイヤー干渉法を用いた相互作用解析

バイオレイヤー干渉法に基づいた相互作用解析装置 OctetRED384 を用いて、アセトアミノフェンと精製 HLA-A*02:06 タンパク質等のこれまでに関連の報告されている医薬品と HLA の組み合わせについてその分子間相互作用を評価した。具体的には、ストレプトアビジンを高密度でセンサー表面上に固定化した Super Streptavidin (SSA) チップにビオチン化精製 HLA タンパク質を固定化した。12 段階に希釈した医薬品を作用させ、得られたシグナル強度からカイネティクス解析を行った。

4) SJS/TEN 症例解析

当部で集積した 257 症例の SJS/TEN 患者の臨床情報から、年齢や性別、感染症併発の有無などの因子が、SJS/TEN 重症化に関連するか否かを検討した。

ロジスティック回帰分析及び Mann-Whitney の U 検定等の統計解析は、EZR を用いて行った。

4. 研究成果

始めに、薬物結合ビーズまたは放射線ラベル体を用いた複数の手法でアセトアミノフェンと HLA-A*02:06 (または HLA-B*44:03) との結合を検討した。しかしこれらの手法では、医薬品と関連する HLA との特異的な相互作用は検出できなかった。そこで、より高感度な分子間相互

作用解析系の確立を試みた。

バイオレイヤー干渉法とは新規の相互作用解析法である。HLA-B*15:02 は、抗てんかん薬カルバマゼピン及びオキシカルバゼピン誘発性 SJS/TEN の発症と関連する事、またこれらの薬物に直接結合することが報告されている。そこで抗てんかん薬カルバマゼピン、オキシカルバゼピンと HLA-B*15:02 との結合をポジティブコントロールとして、またカルバゼピンやオキシカルバゼピン誘発性 SJS/TEN の発症に関連しない HLA 分子との結合をネガティブコントロールとして解析を行った。これまでに OctetRED384 を用いて HLA-B*15:02 とカルバゼピン及びオキシカルバゼピンとの結合を検出し、KD 値を明らかにした。また、アセトアミノフェンと HLA-A*02:06 または HLA-B*44:03 との KD 値を明らかにした。

また、SJS/TEN の発症に関わる遺伝的因子についてはこれまでに明らかとなってきたが、ハイリスク遺伝子を保有しているすべての患者が被疑薬服用後に SJS/TEN を発症するわけではない。このことから、発症に必要な何らかの環境因子が存在することが示唆される。そこで、当部で集積している SJS/TEN の症例解析を行い、感染症の併発が SJS/TEN 重症化のリスク因子であることを見出した。

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)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Okamoto-Uchida Y, Yu R, Miyamura N, Arima N, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, 他 7 名, Penninger JM, Nishina S, Azuma N, Nishina H: The mevalonate pathway regulates primitive streak formation via protein farnesylation. *Scientific Reports*. 2016; 6:37697
2. Okamoto-Uchida Y, Nakamura R, 他 6 名, Saito Y: Different results of IgE binding- and crosslinking-based allergy tests caused by allergen immobilization. *Biol. Pharm. Bull.* 2016; 39: 1662-66.
3. Kaniwa N, Ueta M, Nakamura R, Okamoto-Uchida Y, 他 11 名, Saito Y: Drugs causing severe ocular surface involvements in Japanese patients with Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis. *Allergology International*, 2015; 4:379-81.
4. Yu R, Miyamura N, Okamoto-Uchida Y, Arima N, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Nishina H: A Modified Murine Embryonic Stem Cell Test for Evaluating the Teratogenic Effects of Drugs on Early Embryogenesis. *PLoS One*, 2015; 10: e0145286.
5. Falcone FH, Alcocer MJ, Okamoto-Uchida Y, Nakamura R: Use of Humanized Rat Basophilic Leukemia Reporter Cell Lines as a Diagnostic Tool for Detection of Allergen-Specific IgE in Allergic Patients: Time for a Reappraisal? *Current Allergy & Asthma Reports*, 2015; 15: 67.
6. Maekawa K, 他 8 名, Uchida Y, 他 13 名, Aihara M, Saito Y; *Japan Pharmacogenomics Data Science*

Consortium: Development of a simple genotyping method for the HLA-A*31:01-tagging SNP in Japanese. *Pharmacogenomics*, 2015; 16:1689-99.

7. 岡本(内田)好海, 児玉 進, 中村 亮介, 斎藤 嘉朗「臨床における重症薬疹とゲノムマーカー」谷本学校 毒性質問箱, 2015, 第 17 号: 18-23.

[学会発表] (計 9 件)

1. Yoshimi Okamoto-Uchida, Ryosuke Nakamura, Kimie Sai, Takuya Imatoh, Kayoko Matsunaga, Michiko Aihara, Yoshiro Saito: Effects of Infectious Diseases in the Pathogenesis of Stevens-Johnson Syndrome/Toxic Epidermal Necrolysis 2nd International Stevens-Johnson syndrome symposium, 2017 年 1 月 (京都)
2. 岡本(内田)好海, 中村亮介, 佐井君江, 今任拓也, 松永佳世子, 相原道子, 斎藤嘉朗; スティーブンス・ジョンソン症候群/中毒性表皮壊死症の病態に対する感染症の影響 第 2 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム, 2016 年 9 月 (東京)
3. 岡本(内田)好海, 中村亮介, 佐井君江, 今任拓也, 松永佳世子, 相原道子, 斎藤嘉朗: スティーブンス・ジョンソン症候群/中毒性表皮壊死症における感染症併発の影響 第 23 回日本免疫毒性学会年会 2016 年 9 月 (北九州)
4. 虞 若星, 岡本(内田)好海, 仁科 博史: タンパク質ファルネシル化を介したメバロン酸経路による原始線条形成の制御機構の解明 日本薬学会第 137 回年会, 2017 年 3 月 (仙台)
5. 岡本(内田)好海, 中村亮介, 千貫祐子, 若林翼, 打田光宏, 土屋敏行, 斎藤嘉朗, 森田栄伸: セルベーストアッセイによる牛

肉アレルギー患者血清中 IgE の糖鎖抗原への反応性の解析

日本薬学会第 136 回年会, 2016 年 3 月 (東京)

6. Nakamura R、Kaniwa N, Ueta M, Okamoto-Uchida Y、他 12 名、Saito Y : Drug and HLA types associated with Stevens-Johnson syndrome/ toxic epidermal necrolysis with severe ocular surface involvements in Japanese patients

1st International Stevens-Johnson syndrome symposium, 2016 年 1 月 (京都)

7. 中村亮介、岡本 (内田) 好海、松澤由美子、石井明子、齋藤嘉朗 : EXiLE 法を用いたモデル抗原の IgE エピトープ解析

第 22 回日本免疫毒性学会年会, 2015 年 9 月 (京都)

8. 佐井君江、中村亮介、今任拓也、岡本好海、梶波康二、松永佳世子、相原道子、齋藤嘉朗 : 重篤副作用発症における感染症併発の影響—横紋筋融解症及び重症薬疹の事例—

第 42 回日本毒性学会学術年会, 2015 年 6 月 (金沢)

9. 中村亮介、鹿庭なほ子、上田真由美、岡本 (内田) 好海、杉山永見子、他 10 名、齋藤嘉朗 : 重症眼粘膜障害を伴う SJS/TEN の発症と関連する被疑薬および HLA 型について

第 64 回日本アレルギー学会学術大会, 2015 年 5 月 (東京)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 国立医薬品食品衛生研究所
医薬安全科学部・研究員
岡本 (内田) 好海
(Yoshimi Okamoto-Uchida)

研究者番号 : 40716792

(2)研究分担者 無

研究者番号 :

(3)連携研究者 無

(4)研究協力者 東北大学東北大学大学院
薬学研究科准教授 叶直樹
(Naoki Kanoh)