

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15154

研究課題名(和文)薬剤投与で発症する皮膚薬剤過敏症モデル動物の作成

研究課題名(英文)Development of an animal model of Stevens-Johnson syndrome induced by drugs.

研究代表者

古川 宏 (FURUKAWA, HIROSHI)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00372293

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)：皮膚薬剤過敏症は生命予後に関わる薬剤有害事象であり、ヒト白血球抗原(HLA)との関連は極めて強い。これまでの皮膚薬剤過敏症動物モデルは移植片対宿主病を利用したもので、薬剤による誘発を行わない。本研究では、カルバマゼピン誘発性皮膚薬剤過敏症感受性遺伝子HLA-A\*31:01のトランスジェニックマウスで薬剤投与による皮膚薬剤過敏症モデル動物を作成することを試みた。カルバマゼピンを経口または腹腔内投与しても、皮膚薬剤過敏症様の症状を示さなかったため、Poly (I:C)腹腔内投与後またはX線照射後に、カルバマゼピン経口投与したが、発症しなかった。

研究成果の概要(英文)：Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis are life-threatening drug adverse effects and are associated with human leukocyte antigen (HLA). Established animal models of Stevens-Johnson syndrome are using graft versus host effects. Thus, it was tried to develop an animal model of Stevens-Johnson syndrome induced by carbamazepine. Stevens-Johnson syndrome was not induced with carbamazepine in the transgenic mouse of HLA-A\*31:01, a susceptibility allele for carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome. The treatment with Poly (I:C) or irradiation did not enhance the development of Stevens-Johnson syndrome in the transgenic mouse of HLA-A\*31:01.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ヒトの薬物動態・代謝予測系 皮膚薬剤過敏症

### 1. 研究開始当初の背景

多因子疾患は環境要因と遺伝要因の作用によって発症する疾患であり、環境要因と遺伝要因はそれぞれ独立に疫学研究と遺伝疫学研究によって調べられてきたが、その相互作用が注目されている。また、加齢に伴い服用する薬剤の種類と量は増える傾向にあり、多因子疾患としての薬剤有害事象の発症頻度も高齢者に高いことから、日本人の身体を取り巻く環境要因としての薬剤は無視できない存在となりつつある。そのなかで、薬剤応答性は薬剤という環境要因に対する反応であり、この応答性を決める遺伝要因に関するゲノム薬理学研究は次第に重要性を増している。

薬剤有害事象には皮疹・痒痒・肝障害・腎障害・血球減少・間質性肺病変・悪性腫瘍・口内炎・結核・帯状疱疹などがあり、これらは生命予後に重大な影響を及ぼしうるにもかかわらず、発症機序の解明や治療法の確立は不十分である。薬剤有害事象には、発症が投与量に依存せず、ヒト白血球抗原(HLA)と強く関連するものがあることから、IV型アレルギー反応の関与も示唆される。

近年、薬剤応答性に関わる遺伝要因の研究報告が相次いでおり、原因薬剤ごとに異なるHLAアレルと関連している。日本で皮膚薬剤過敏症(Stevens-Johnson症候群、中毒性表皮壊死症)の発症頻度が他国と比べて著しく高いことは、日本人特有のHLAアレルによる遺伝要因の関与を示唆している。HLAと一部の薬剤有害事象との関連は極めて強く、原因薬剤ごとに異なるアレルとの関連が報告されている。皮膚薬剤過敏症は、HLA-A\*31:01(ヨーロッパ系、日本人)とB\*15:02(中国人)がカルバマゼピン(CBZ)と、B\*58:01(ヨーロッパ系、日本人、中国人)がアロプリノールと、B\*57:01(ヨーロッパ系、アフリカ系)がアバカビルと、B\*59:01(日本人、韓国人)がメタゾラムドと関連する。我々もメトトレキサート誘発性間質性肺病変とA\*31:01との関連および、プシラミン誘発性腎障害とDRB1\*08:02との関連を明らかにした。しかしながら、HLA分子の皮膚薬剤過敏症への関わりは不明なままである。

### 2. 研究の目的

HLAと関連する薬剤過敏性反応の病態はまだ明らかではない。HLA分子が薬剤で修飾されてT細胞を活性化する可能性もあるが(p-i仮説)、薬剤やその代謝物がハプテンとして働いてHLAに提示されたペプチドを修飾する可能性もある。薬剤がHLAクラスI分子の溝にはまることによって、提示されるペプチドのrepertoireが変化し、アロ認識をするCD8+T細胞が活性化されるとする説もある。以上のような仮説は示されているが、HLAと強く関連する皮膚薬剤過敏症のモデル動物はほとんどない。モデル動物を用いた皮膚薬剤過敏症の病因・病態の解明は極めて重要であると

同時に、まさに今求められている研究である。この研究では、CBZ誘発性皮膚薬剤過敏症感受性遺伝子A\*31:01のトランスジェニック(Tg)マウスを作成し、これを用いたCBZ誘発性皮膚薬剤過敏症モデルを作りあげる。野生型では皮膚薬剤過敏症モデルの作成が不可能であっても、A\*31:01Tgマウスでは作成できる可能性がある。これを用いて、CBZ誘発性皮膚薬剤過敏症の病態形成に重要な役割を果たしている生理活性物質・miRNA等を明らかにする。

本研究では、生理活性物質・miRNA等の分子病態の側面から、HLAに関わる薬剤有害事象の病態を解明することを目的としており、皮膚薬剤過敏症の予防法・治療法の確立上、多数の有用な知見が見いだされると期待される。

### 3. 研究の方法

カルバマゼピン(CBZ)誘発性皮膚薬剤過敏症感受性遺伝子A\*31:01のトランスジェニックマウスが準備されている。細胞表面への発現効率を上げ、マウスCD8分子による認識を確実にするため、HLA-A\*31:01の3ドメインをマウスMHCクラスIのH2-Dbの3ドメインと交換したキメラ分子をヒト2ミクログロブリンとともに細胞表面に発現させた。1% polysorbate 80水溶液に懸濁したCBZを腹腔内投与するか、0.5% carboxymethyl cellulose sodium水溶液に懸濁したCBZを経口投与することで、皮膚薬剤過敏症モデル動物を作成し、肉眼的な病変の拡がりや、顕微鏡的な組織病変の程度で皮膚薬剤過敏症を評価した。

### 4. 研究成果

カルバマゼピン誘発性皮膚薬剤過敏症感受性遺伝子HLA-A\*31:01のトランスジェニックマウスを準備し、次世代シーケンサーを用いてTgマウスの全ゲノムシーケンスを行い、トランスジーン挿入位置を同定することにより、挿入遺伝子のジェノタイプング法を確立した。

このトランスジェニックマウスで薬剤投与による皮膚薬剤過敏症モデル動物を作成することを試みた。C57BL/6マウスおよびTgマウスにCBZを腹腔内投与(90mg/kg ip)/または経口投与(50mg/kg)したのちに、肉眼的な病変の拡がりや、顕微鏡的な組織病変の程度で皮膚薬剤過敏症を評価した。しかし、皮膚薬剤過敏症モデル動物を作成することはできなかった。

皮膚薬剤過敏症の発症はウイルス感染と関わりがあるという報告もあるため、Poly(I:C)(150µg)腹腔内投与後またはX線(3.5Gy)照射後に、CBZ経口投与(50mg/kg)を行ってみたにもかかわらず、皮膚薬剤過敏症モデル動物を作成することはできなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. Oka S, Higuchi T, Furukawa H, Nakamura M, Komori A, Abiru S, Nagaoka S, Hashimoto S, Naganuma A, Naeshiro N, Yoshizawa K, Shimada M, Nishimura H, Tomizawa M, Kikuchi M, Makita F, Yamashita H, Ario K, Yatsushashi H, Tohma S, Kawasaki A, Tsuchiya N, Migita K. Association of a Single Nucleotide Polymorphism in TNIP1 with Type 1 Autoimmune Hepatitis in the Japanese Population. *J Hum Genet.* 2018 in press
2. Oka S, Furukawa H, Yasunami M, Kawasaki A, Nakamura H, Nakamura M, Komori A, Abiru S, Nagaoka S, Hashimoto S, Naganuma A, Naeshiro N, Yoshizawa K, Yamashita H, Ario K, Ohta H, Sakai H, Yabuuchi I, Takahashi A, Abe K, Yatsushashi H, Tohma S, Ohira H, Tsuchiya N, Migita K. HLA-DRB1 and DQB1 alleles in Japanese Type 1 Autoimmune Hepatitis: the predisposing role of the DR4/DR8 heterozygous genotype. *PLoS ONE.* 2017;12(10):e0187325.
3. Hashimoto A, Suto S, Horie K, Fukuda H, Nogi S, Iwata K, Tsuno H, Ogihara H, Kawakami M, Komiya A, Furukawa H, Matsui M, Tohma S. Incidence and risk factors for infections requiring hospitalization, including pneumocystis pneumonia, in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheumatol.* 2017;2017:6730812
4. Kawasaki A, Yamashita K, Hirano F, Sada K, Tsukui D, Kondo Y, Kimura Y, Asako K, Kobayashi S, Yamada H, Furukawa H, Nagasaka K, Sugihara T, Yamagata K, Sumida T, Tohma S, Kono H, Ozaki S, Matsuo S, Hashimoto H, Makino H, Arimura Y, Harigai M, Tsuchiya N. Association of ETS1 polymorphism with granulomatosis with polyangiitis and proteinase 3-anti-neutrophil cytoplasmic antibody positive vasculitis in a Japanese population. *J Hum Genet.* 2018;63(1):55-62.
5. Asano T, Furukawa H, Sato S, Yashiro M, Kobayashi H, Watanabe H, Suzuki E, Ito T, Ubara Y, Kobayashi D, Iwanaga N, Izumi Y, Fujikawa K, Yamasaki S, Nakamura T, Koga T, Shimizu T, Umeda M, Nonaka F, Yasunami M, Ueki Y, Eguchi K, Tsuchiya N, Tohma S, Yoshiura K, Ohira H, Kawakami A, Migita K. Effects of HLA-DRB1 alleles on susceptibility and clinical manifestations in Japanese patients with adult onset Still's disease. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):199.
6. Iwata K, Oka S, Tsuno H, Furukawa H, Shimada K, Hashimoto A, Komiya A, Tsuchiya N, Katayama M, Tohma S. Biomarker for nontuberculous mycobacterial pulmonary disease in patients with rheumatoid arthritis: anti-glycopeptidolipid core antigen immunoglobulin A antibodies. *Mod Rheumatol.* 2018;28(2):271-275.
7. Furukawa H, Oka S, Shimada K, Tsuchiya N, Tohma S, the Rheumatoid Arthritis associated Interstitial Lung Disease Study Consortium. Response to: 'HLA-A 31:01 is not associated with the development of methotrexate pneumonitis in the UK population: results from a genome wide association study.' by Bluett et al. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(12):e52.
8. Terao C, Kawaguchi T, Dieude P, Varga J, Kuwana M, Hudson M, Kawaguchi Y, Matucci-Cerinic M, Ohmura K, Riemekasten G, Kawasaki A, Airo P, Horita T, Oka A, Hachulla E, Yoshifuji H, Caramaschi P, Hunzelmann N, Baron M, Atsumi T, Hassouns P, Torii T, Takahashi M, Tabara Y, Shimizu M, Tochimoto A, Ayuzawa N, Yanagida H, Furukawa H, Tohma S, Hasegawa M, Fujimoto M, Ishikawa O, Yamamoto T, Goto D, Asano Y, Jinnin M, Endo H, Takahashi H, Takehara K, Sato S, Ihn H, Raychaudhuri S, Liao K, Gregersen P, Tsuchiya N, Riccieri V, Melchers I, Valentini G, Cauvet A, Martinez M, Mimori T, Matsuda F, Allanore Y. Trans-ethnic meta-analysis identifies GSDMA and PRDM1 as susceptibility genes to systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(6):1150-1158.
9. Izumi Y, Akazawa M, Akeda Y, Tohma S, Hirano F, Ideguchi H, Matsumura R, Miyamura T, Mori S, Fukui T, Iwanaga N, Jiuchi Y, Kozuru H, Tsutani H, Saisyo K, Sugiyama T, Suenaga Y, Okada Y, Katayama M, Ichikawa K, Furukawa H, Kawakami K, Oishi K, Migita K. The 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in patients with rheumatoid arthritis: a double-blinded, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):15.
10. Oka S, Furukawa H, Shimada K, Hashimoto A, Komiya A, Fukui N, Tsuchiya N, Tohma S. Plasma miRNA

Expression Profiles in Rheumatoid Arthritis Associated Interstitial Lung Disease. *BMC Musculoskeletal Disord.* 2017;18(1):21.

11. Higuchi T, Oka S, Furukawa H, Nakamura M, Komori A, Abiru S, Nagaoka S, Hashimoto S, Naganuma A, Naeshiro N, Yoshizawa K, Shimada M, Nishimura H, Tomizawa M, Kikuchi M, Makita F, Yamashita H, Ario K, Yatsushashi H, Tohma S, Kawasaki A, Ohira H, Tsuchiya N, Migita K. Association of a single nucleotide polymorphism upstream of ICOS with Japanese autoimmune hepatitis type 1. *J Hum Genet.* 2017;62(4):481-484.
12. Hachiya Y, Kawasaki A, Oka S, Kondo Y, Ito S, Matsumoto I, Kusaoi M, Amano H, Suda A, Setoguchi K, Nagai T, Shimada K, Sugii S, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Ohno S, Katayama M, Kono H, Hirohata S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Nagaoka S, Tohma S, Furukawa H, Tsuchiya N. Independent Association of HLA-G 3' Untranslated Region 14bp Indel Polymorphism with Systemic Lupus Erythematosus in a Japanese Population: a Case-control Association Study. *PLoS ONE.* 2016;11(6): e0158065.
13. Kawasaki A, Hasebe N, Hidaka M, Hirano F, Sada K, Kobayashi S, Yamada H, Furukawa H, Yamagata K, Sumida T, Miyasaka N, Tohma S, Ozaki S, Matsuo S, Hashimoto H, Makino H, Arimura Y, Harigai M, Tsuchiya N. Protective role of HLA-DRB1\*13:02 against microscopic polyangiitis and MPO-ANCA positive vasculitis in a Japanese population: a case-control study. *PLoS ONE.* 2016;11(5):e0154393.
14. Furukawa H, Oka S, Kawasaki A, Shimada K, Sugii S, Matsushita T, Hashimoto A, Komiya A, Fukui N, Kobayashi K, Osada A, Ihata A, Kondo Y, Nagai T, Setoguchi K, Okamoto A, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Kono H, Katayama M, Hirohata S, Sumida T, Migita K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S, Nagaoka S, Takehara K, Tohma S, Tsuchiya N. Human Leukocyte Antigen and Systemic Sclerosis in Japanese: The Sign of the Four Independent Protective Alleles, DRB1\*13:02, DRB1\*14:06, DQB1\*03:01, and DPB1\*02:01. *PLoS ONE.* 2016;11(4):e0154255.

[学会発表](計15件)

1. 岡笑美, 古川宏, 當間重人, 川崎綾, 土屋

尚之, 右田清志:自己免疫性肝炎と TNIP1 遺伝子多型の関連(第28回日本リウマチ学会関東支部学術集会 2017年12月9日東京)

2. 樋口貴土, 吉村美郁, 岡笑美, 川崎綾, 蕨栄治, 水野聖哉, 小野栄夫, 高橋智, 當間重人, 土屋尚之, 古川宏:食餌によるメトトレキサート毒性の増強(第28回日本リウマチ学会関東支部学術集会 2017年12月9日東京)
3. 福井尚志, 田中信帆, 田代俊之, 桂川陽三, 古川宏, 大橋暁, 増田公男, 岩澤三康, 森俊仁, 當間重人:関節リウマチとの比較による変形性関節症の滑膜病変の成立機序に関する検討(第28回日本リウマチ学会関東支部学術集会 2017年12月9日東京)
4. 田中信帆, 田代俊之, 桂川陽三, 古川宏, 大橋暁, 増田公男, 岩澤三康, 森俊仁, 當間重人, 福井尚志:変形性関節症と関節リウマチの滑膜組織における miRNA の発現比較(第28回日本リウマチ学会関東支部学術集会 2017年12月9日東京)
5. 樋口貴土, 吉村美郁, 岡笑美, 川崎綾, 蕨栄治, 水野聖哉, 小野栄夫, 高橋智, 當間重人, 土屋尚之, 古川宏:食餌によるメトトレキサート毒性の増強(第38回日本臨床薬理学会学術総会 2017年12月7-9日横浜)
6. 岡笑美, 古川宏, 當間重人, 川崎綾, 土屋尚之, 右田清志:自己免疫性肝炎と TNIP1 遺伝子多型の関連(第71回国立病院総合医学会 2017年11月10-11日高松)
7. 田中信帆, 古川宏, 大橋暁, 岩澤三康, 増田公男, 森俊仁, 福井尚志:変形性関節症における滑膜病変の成立機序の検討-関節リウマチとの遺伝子発現の比較からわかること-(第61回日本リウマチ学会 2017年4月20-22日福岡)
8. 岡笑美, 古川宏, 當間重人, 川崎綾, 土屋尚之, 右田清志:自己免疫性肝炎と TNIP1 遺伝子多型の関連(第61回日本リウマチ学会 2017年4月20-22日福岡)
9. 古川宏, 岡笑美, 川崎綾, 島田浩太, 杉井章二, 松下貴史, 橋本篤, 小宮明子, 福井尚志, 小林幸司, 長田侑, 井畑淳, 近藤裕也, 永井立夫, 瀬戸口京吾, 岡本明子, 岡本享, 千葉実行, 末松栄一, 河野肇, 片山雅夫, 廣畑俊成, 住田孝之, 右田清志, 長谷川稔, 藤本学, 佐藤伸一, 長岡章平, 竹原和彦, 當間重人, 土屋尚之:HLA クラス II と強皮症(第20回強皮症研究会議 2017年1月14日東京)
10. 岡笑美, 古川宏, 島田浩太, 橋本篤, 小宮明子, 土屋尚之, 當間重人:関節リウマチ関連間質性肺病変における血漿中 miRNA(第70回国立病院総合医学会 2016年11月11-12日宜野湾)
11. 吉村美郁, 樋口貴土, 岡笑美, 川崎綾, 蕨栄治, 水野聖哉, 小野栄夫, 高橋智, 當間

重人, 土屋尚之, 古川宏: マウスにおける高脂肪食によるメトトレキサート毒性の増強(第3回 日本リウマチ学会ベーシックリサーチカンファレンス 2016年10月14-15日東京)

12. 樋口貴士, 岡笑美, 古川宏, 小森敦正, 八橋弘, 中村稔, 川崎綾, 土屋尚之, 右田清志: 日本人における自己免疫性肝炎発症に関わる遺伝要因(第44回日本臨床免疫学会総会 2016年9月8-10日東京)
13. 吉村美郁, 樋口貴士, 岡笑美, 川崎綾, 藤栄治, 水野聖哉, 小野栄夫, 高橋智, 當間重人, 土屋尚之, 古川宏: HLA-A\*31:01 遺伝子導入マウスを用いたメトトレキサート誘導性間質性肺炎モデルの作成と評価(第44回日本臨床免疫学会総会 2016年9月8-10日東京)
14. 岡笑美, 古川宏, 島田浩太, 橋本篤, 小宮明子, 土屋尚之, 當間重人: 関節リウマチに合併する間質性肺病変と血漿中 miRNA 発現(第60回日本リウマチ学会 2016年4月21-23日横浜)
15. 古川宏, 岡笑美, 川崎綾, 島田浩太, 杉井章二, 松下貴史, 橋本篤, 小宮明子, 小林幸司, 長田侑, 井畑淳, 永井立夫, 瀬戸口京吾, 岡本明子, 岡本享, 千葉実行, 末松栄一, 河野肇, 片山雅夫, 廣畑俊成, 右田清志, 長谷川稔, 藤本学, 佐藤伸一, 竹原和彦, 長岡章平, 當間重人, 土屋尚之: 抗セントロメア抗体陽性強皮症と HLA-DQB1 との関連(第60回日本リウマチ学会 2016年4月21-23日横浜)

〔図書〕(計1件)

1. 八谷有紀, 古川宏, 土屋尚之: 遺伝因子「強皮症の基礎と臨床: 病態の解明から最新の診療まで」(佐藤伸一編) 医薬ジャーナル社、大阪、2016 Aug 20;60-69.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 宏 (FURUKAWA HIROSHI)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号: 00372293

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

土屋尚之 (TSUCHIYA NAUYUKI)  
筑波大学・医学医療系・教授