

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18932

研究課題名(和文) HLAの関与する特異体質薬物毒性発症のin vitro予測を志向した基盤研究

研究課題名(英文) Construction of in vitro methods to predict the onset of HLA-mediated idiosyncratic drug toxicity

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：HLA多型の関与する特異体質薬物毒性の発症機序については不明な点が多く、その予測基盤も構築されていない。本研究ではまず、HLA-B*57:01遺伝子導入マウスより単離したケラチノサイトに原因薬物であるアバカビルを曝露することによって、ストレス応答性シグナルが亢進し、それが樹状細胞を活性化させることを示した。続いて、薬物曝露に伴ったHLAの構造変化をファージディスプレイ法を用いて予測するための基盤を構築した。さらに、薬物毒性発症のリスクのあるHLA多型は構造的に不安定であることをコンピュータシミュレーションなどの解析から明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HLAの関与する特異体質薬物副作用として薬疹が好発するが、なぜ皮膚で副作用が発症しやすいのか、そのメカニズムは不明であった。本研究では、ケラチノサイトがHLA多型特異的に薬物応答を示すことを明らかとしており、副作用回避を指向した発症機序の全容解明への大きな一歩となった。さらに、薬物の曝露に伴ったHLAの構造変化が副作用発症を決定づけているが、それを簡便に予測する方法論の構築にも成功した。今後のさらなる研究の発展によって、安全性を意識した医薬品開発に対する貢献や、予期せぬ副作用を回避した個別化医療の実現に還元できるものと期待している。

研究成果の概要(英文)：The onset mechanism of HLA-mediated idiosyncratic drug toxicity has been unclear, and hence appropriate prediction methods have not been established. Here, we showed that in keratinocytes derived from HLA-B*57:01 transgenic mice, stress-responsive MAPK pathway was activated by abacavir, followed by the activation of dendritic cells. Next, we constructed an in vitro method for predicting conformational changes of HLA complex associated with drug exposure using phage display. Furthermore, from in silico computer simulations and in vitro analyses, we clarified that the structural stability of HLA complex, which is associated with drug hypersensitivity and/or toxicity, was relatively low.

研究分野：医薬品安全性学

キーワード：特異体質薬物毒性 HLA 薬疹 ケラチノサイト ファージディスプレイ 分子動力学シミュレーション
アバカビル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬物による副作用は、中毒性と特異体質性に大別され、前者は *in vitro* 試験や動物実験で再現可能であるが、後者は動物実験においても再現が困難であり、適切な *in vitro* 予測法も確立していないのが現状である。そのため、医薬品の臨床試験段階や市販後に多くの患者に使用されて初めて問題として浮上することがあり、企業リスクも非常に大きい。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薬物毒性とヒト白血球抗原 (HLA) 多型との関連が示唆されてきた。例えば、抗 HIV 薬アバカビルによる重症薬疹の発症頻度は、HLA-B*57:01 多型保有者で非保有者に比べて 100 倍以上高まることが示されており、特に欧米では投薬前多型診断も実施されている。国内では、抗てんかん薬カルバマゼピンによる過敏症と HLA-A*31:01 との関連報告もあり、前向きな臨床試験が実施されている。

このように、HLA 多型と特異体質薬物毒性発症との関連を示す臨床報告は現在でも増えつつあるが、その因果関係を前向きに示した例や毒性発現の背後に潜む分子機序を明らかとした例はこれまでに存在しない。また、近年、HLA-B*57:01 によるアバカビルの提示が、従来考えられていたような、薬物がペプチドに共有結合して抗原提示される“ハプテン仮説”とは異なり、薬物が直接 HLA のポケットに入ることで提示されるペプチドのレパートリーが変化する、いわゆる“Altered peptide repertoire 仮説”が報告された。しかし、HLA の関与する薬物毒性が皮膚で好発するメカニズムなど、毒性発現機構については依然明らかとされていない。よって、HLA の関与する薬物副作用の組織特異性を決定づけるメカニズムの解明や、毒性発現機構を踏まえたうえでの薬物副作用の予測手法の構築が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、未だ仮説レベルに留まっている特異体質薬物毒性の実体を *in vitro* 初代共培養系から究明し、組織特異的毒性発現のメカニズムを紐解くことを第一の目的とする。具体的には、HLA の関与する特異体質薬物毒性が皮膚で好発することに着目し、ケラチノサイトを中心とした免疫応答を評価する。

また、特定の HLA 多型を保有していれば、標的となる組織・細胞に被験薬物が曝露されることで、通常とは異なる抗原 (異常抗原) の提示が起こり、それが毒性発現の引き金となることが推察されるが、それら個々の抗原を同定して毒性発現リスクを予測することは非現実的である。そこで、特異体質薬物毒性発症の可能性を、いかなる HLA 多型・組織・薬物の組み合わせであっても予測可能となる *in vitro* スクリーニング系の基盤を構築することを第二の目的とする。具体的には、特定の HLA 多型に異常抗原が発現しているか否かを、それらを認識する特異的な抗体の出現可能性によって評価できないかと考え、抗体スクリーニングに汎用されているファージディスプレイ法による毒性予測が可能か検討する。

特定の HLA 多型分子に薬物が結合することで HLA 複合体の構造的な変化が生じ、それが毒性に繋がっているのではないかと考え、それを踏まえた毒性予測法の構築が上記の通りである。ここではさらに、HLA に薬物が結合することは HLA そのものに何らかの構造的特徴があるからこそ生じると仮説を立て、HLA そのものの安定性およびそこに薬物が結合した際の安定性を *in silico* 解析を中心に検討する。これらの解析によって、HLA の関与する薬物毒性発症のポテンシャルを予め知ることができるものと期待している。

以上の解析は、HLA-B*57:01 多型とその保有者で過敏症・薬疹発症の報告のあるアバカビルの組み合わせを例として行う。一部の検討は、カルバマゼピンによる重症薬疹発症の報告がある HLA-B*15:02 多型も含めて行う。

3. 研究の方法

(1) ケラチノサイトに対する薬物の曝露

1~3 日齢の HLA-B*57:01 遺伝子導入マウス (B*57:01-Tg)、陰性対照の HLA-B*57:03 遺伝子導入マウス (B*57:03-Tg) またはそれらのリッターメイトマウスより次の要領でケラチノサイトを単離・培養した。新生児マウスの頭部、四肢、尾をハサミで切断した。皮膚を剥いだ後、CnT-PR 培地に漬け、dispase 溶液 (5 mg/mL in CnT-PR) に移し、4 で 16~20 時間ほどインキュベーションした。続いて、表皮を剥離し、accutase 溶液にて 30 分ほど室温でインキュベーションした。CnT-PR 培地を加え、表皮シートをピンセットを使って揺らし、シングルセルを液中に懸濁させた。細胞懸濁液を遠心チューブに回収し、150 × g で 4 分遠心した後、細胞を CnT-PR 培地で懸濁し、コラーゲンコートをしたシャーレ上に播種した。

播種後約 20 時間後に培養液を交換した。さらに 3 日間培養し、CnT-PR Diff 培地にて薬物の曝露を行った。

(2) 骨髄細胞由来樹状細胞 (BM-DC) の単離・培養

6~8 週齢の C57BL/6 マウスの脛骨および大腿骨から骨髄を採取し、RPMI 1640 培地で懸濁した。セルストレーナーに通し、500 × g で 5 分遠心した後、細胞ペレットを DC culture medium (30 ng/mL recombinant mouse GM-CSF を添加した RPMI 1640 培地) で懸濁し、コラーゲンコートをしたプレート上に播種した。その 2 日後に等量の DC culture medium を添加し、播種 5 日後に検討に用いた。

(3) ファージディスプレイ法による HLA 認識ファージの取得

HLA 複合体に結合するタンパクをスクリーニングするため、各 CDR 領域がランダム化されたヒト抗体重鎖可変領域フラグメント (VH) を提示する M13 ファージを用いた。HeLa 細胞に HLA 遺伝子 (FLAG タグを付加し、HLA と 2m を 2A ペプチドで繋いでいる) を導入し、一過性に発現させた HLA 複合体を抗 FLAG M2 抗体磁気ビーズに結合させた。このビーズに対して 3×10^9 の多様性を持つファージライブラリーを曝露し、結合したファージを 0.1 M Gly-HCl (pH 3.0) にて溶出させた。一連のアフィニティパンニングのサイクルを 3 から 4 回繰り返した後に、回収されたファージクローンの遺伝子配列をシーケンス解析によって確認した。

(4) フローサイトメトリーによるファージの HLA への結合評価

単離された各ファージクローンを大腸菌に感染させて増幅し、培地上清中から PEG 沈殿によってファージ顆粒を精製し、PBS に懸濁した。このファージクローンの HLA 複合体への結合能を調べるため、(3) と同様に HeLa 細胞に遺伝子を導入して HLA 複合体を発現させ、24 時間後にアバカビルを曝露した。さらに 24 時間後に accutase を用いて HeLa 細胞を剥離し、ファージ顆粒を 4 で結合させた。ファージ顆粒を Alexa 蛍光標識した抗 M13 抗体によって標識し、HLA 複合体に対するファージクローンの結合量をフローサイトメーターを用いて評価した。

(5) in silico による分子動力学シミュレーション

In silico シミュレーションには Protein Data Bank (PDB) に登録されている結晶構造を用いた。アバカビルが結合している HLA-B*57:01 として 3VRI、アバカビルが結合していない HLA-B*57:01 として 3VH8、HLA-B*57:03 として 2BVP を使用した。PDB ファイル上の HLA-B*57:01 結晶構造 (PDB : 3VRI、3VH8) のアミノ酸配列を 114 Asp Asn、116 Ser Tyr、HLA-B*57:03 結晶構造 (PDB : 2BVP) のアミノ酸配列を 114 Asn Asp、116 Tyr Ser へと置換することで、HLA-B*57:01 と HLA-B*57:03 間の構造をコンピュータ上で相互変換させた。In silico シミュレーションに用いた薬物の 3 次元構造は Gauss View 5/Gaussian 09 により作成した。

分子動力学シミュレーションは以下の方法で行った。各 HLA 結晶構造の周辺に LEaP モジュールを用いて、溶媒として 10 四方の TiP3P 水分子を設定し、また系の中和のために対イオンを配置した。次いで、AMBER 16 によりエネルギーの最小化、加熱、分子動力学シミュレーションを順次行った。各構造に対するシミュレーションは、等温定圧アンサンブル (NPT-ensemble) 条件下 (1 気圧、310K)、2.0 fs の積分時間ステップで 100 ns まで実行した。長距離相互作用のカットオフ値は 12.0 とした。

分子動力学シミュレーションの解析は以下の方法で行った。平均二乗偏差 (RMSD) 値の計算および主成分分析 (PCA) による構造分類は ptraj モジュールによって行った。100 ns のシミュレーションの中で 100 ps ごとに全 1,000 個の構造スナップショットを取得した。シミュレーションに伴う RMSD 値の変動を 100 ps 毎に、合計で 1,000 個のタイムポイントとしてプロットした。また、得られた 1,000 個の構造を PCA により 2 次元展開しプロットした。

(6) HLA と 2-microglobulin (2m) との結合評価

HeLa 細胞に HLA 遺伝子を導入し、一過性に HLA および 2m を発現させた。遺伝子導入から 48 時間後に、可溶化バッファー (150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.5 % Nonidet P-40) を加えて、細胞溶解液を取得した。細胞溶解液を抗 FLAG M2 抗体磁気ビーズと合わせ、4 でインキュベーションすることによって HLA 複合体をビーズに結合させた。反応後のビーズを可溶化バッファーで洗浄した後、0.1 M Gly-HCl (pH 3.0) にて HLA 複合体を溶出し、中和バッファー (1.5 M NaCl、0.5 M Tris-HCl (pH 8.0)) を加えて中和した。

次いで、SDS-PAGE を行い、PVDF メンブレンに転写した。メンブレンをブロッキングした後に抗 FLAG 抗体および抗 2m 抗体とインキュベーションし、対応する 2 次抗体と反応させ、ECL prime detection reagent を用いて目的のタンパク質を検出した。

4. 研究成果

(1) B*57:01-Tg 由来のケラチノサイトはアバカビル刺激を受けてストレス応答を示す

HLA 遺伝子導入マウスより採取したケラチノサイトに対してアバカビルを曝露し、mRNA の発現量を DNA マイクロアレイによって測定したところ、B*57:03-Tg 由来のケラチノサイトと比較して B*57:01-Tg 由来のケラチノサイトでは、カルシウムシグナリングや MAPK シグナリングなどに関連する mRNA の上昇が認められた。

さらに、ウェスタンブロットティングによって細胞内シグナルをより詳細に評価したところ、B*57:01-Tg 由来のケラチノサイトではアバカビルの刺激によってストレス応答性 MAPK 経路である JNK 経路の c-Jun のリン酸化が認められた。一方で、細胞増殖などにかかわる古典的 MAPK 経路の MEK や ERK のリン酸化は、アバカビル刺激によって減弱する傾向にあった。さらに、ER ストレスの阻害薬である 4-phenylbutylate を前処置したところ、アバカビル刺激に伴った JNK 経路の亢進は抑制された。これらの結果から、B*57:01-Tg 由来のケラチノサイトは、アバカビルによる刺激を受けて、ER ストレスの亢進、およびそれに続く JNK シグナルの活性化が起こることが示唆された。

(2) 薬物曝露に伴ったケラチノサイトにおける免疫応答は樹状細胞を活性化させる

次に、B*57:01-Tg 由来のケラチノサイトにアバカビルを曝露したときに生じる応答が、樹状細胞の活性化へと続く獲得免疫系の亢進に關与するか検討した。そこで、B*57:01-Tg 由来のケラチノサイトにアバカビルを曝露して 24 時間後の培養上清を B*57:01-Tg 由来または野生型マウス由来の BM-DC に添加したところ、樹状細胞の活性化マーカーである CD86 の発現量上昇が認められた。また、これらの現象は、B*57:03-Tg 由来のケラチノサイトを用いた場合や、単に BM-DC へのアバカビルの曝露のみでは観察されなかった。さらに、B*57:01-Tg 由来のケラチノサイトに 4-phenylbutylate を前処置した後にアバカビルを曝露した培養上清を BM-DC に添加した際には、CD86 の発現量上昇は認められなかった。これらの結果から、B*57:01-Tg 由来のケラチノサイトにアバカビルを曝露することで、ER ストレスを起点とした細胞内シグナルが亢進し、その下流で樹状細胞を活性化する液性因子を放出していることが示唆された。

(3) 薬物の曝露により構造変化した HLA をファージディスプレイ法で検出できる

HLA-B*57:01 複合体に対するアフィニティパンニングにより、4 種類のファージクローンが再現性を持って回収された。回収されたファージクローンのうち 3 つは HLA-B*57:01 複合体に対する親和性を保有していることがフローサイトメトリーによって確認された。次に HLA-B*57:01 複合体にアバカビルを曝露した上でフローサイトメトリーを行ったところ、ファージクローンの HLA-B*57:01 複合体に対する親和性が増大することが示された。一方で、HLA-B*57:03 を用いて同様の実験を行った場合、HLA-B*57:01 の時と同一のファージクローンが回収され、フローサイトメトリーにより HLA-B*57:03 複合体に対する結合も確認されたが、アバカビルの曝露による結合量の変化は認められなかった。これらの結果から、薬物曝露に伴う HLA 複合体の構造変化を検出する上でファージディスプレイ法が有用であることが示された。

(4) HLA-B*57:01 は HLA-B*57:03 と比べて構造的に不安定である

PDB に登録されている HLA (1- 3 ドメイン ; 1-276 残基) - 2m (277-375 残基) 複合体結晶構造を用いて HLA の構造安定性を分子動力学シミュレーションによって評価した。シミュレーションの後、HLA の抗原結合部位 (1- 2 ドメイン ; 1-180 残基) について RMSD 値を算出した。その結果、HLA-B*57:03 は比較的一定な RMSD 値を示した一方で、HLA-B*57:01 は大きな数値の変動を示すことが明らかとなった。また、シミュレーションによって得られた 1,000 個のポーズを PCA によって構造分類した結果、HLA-B*57:03 では構造の類似性が高かったが、HLA-B*57:01 では複数の構造群に分類された。これらの結果から、HLA-B*57:01 はシミュレーションの過程で常に構造変化を繰り返しており、構造が安定化していないことが示唆された。

次に、HLA-B*57:01 および HLA-B*57:03 結晶構造のアミノ酸を人工的に置き換えた構造を作成し、アミノ酸置換構造についても同様に分子動力学シミュレーションを行った。その結果、HLA-B*57:03 ではアミノ酸を HLA-B*57:01 型に置換することで RMSD 値の変動が増加した一方で、HLA-B*57:01 ではアミノ酸を HLA-B*57:03 型に置換することで RMSD 値の変動が減少した。PCA による構造分類からも、アミノ酸の置換により、結果が逆転することが示された。これらの結果から、分子動力学シミュレーションによる HLA 構造の解析結果は、初期の結晶構造ではなく HLA 分子 (アミノ酸配列) に依存していることが示唆され、リスク多型である HLA-B*57:01 は構造的に不安定であることが明らかとなった。

最後に、HLA-B*57:01 とアバカビルが結合している状態の結晶構造に対して分子動力学シミュレーションを行い、アバカビルの結合が HLA- 2m 複合体の安定性に与える影響を調べた。その結果、アバカビルの存在下でシミュレーションを行った際には、RMSD 値の変動が減少する傾向が確認された。また、PCA による構造分類において、アバカビルの存在時に 1st component の幅が狭くなったことから、構造の類似性が増加する傾向が認められた。これらの結果から、アバカビルの結合によって HLA-B*57:01 複合体が構造的に安定化していることが示唆された。

(5) リスク HLA 多型では、HLA と 2m との相互作用が減弱している

HLA および 2m を発現させた細胞から免疫沈降により HLA 複合体を回収し、その際に HLA 分子と共沈降された 2m の量をウェスタンブロッティングによって評価した。その結果、全細胞における HLA および 2m の発現量には大きな差は認められなかった一方で、免疫沈降サンプルにおいて HLA-B*57:01 に結合している 2m 量は、HLA-B*57:03 の場合と比較して少ないことが明らかとなった。また、アバカビルの曝露の有無は 2m の結合量に影響しなかった。

さらに、同様の解析を HLA-B*15:02 多型を用いて行ったところ、HLA-B*15:02 に結合している 2m 量は、HLA-B*15:01 の場合と比較して少ないことも示された。HLA-B*57:01 および HLA-B*15:02 はいずれも薬物 (それぞれ、アバカビルとカルバマゼピン) による毒性発症リスク多型であり、このような HLA 複合体の安定性の低下 (2m との親和性の低下) が、薬物との結合ポテンシャル増大に寄与している可能性が考えられた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Binbin Song, Shigeki Aoki, Cong Liu, Takeshi Susukida, Kousei Ito. An animal model of abacavir-induced HLA-mediated liver injury. Toxicological Sciences.

162(2):713-723, 2018. (査読有)

DOI: 10.1093/toxsci/kfy001

Takeshi Susukida, Shigeki Aoki, Kotaro Kogo, Sota Fujimori, Binbin Song, Cong Liu, Shuichi Sekine, Kousei Ito. Evaluation of immune-mediated idiosyncratic drug toxicity using chimeric HLA transgenic mice. Archives of Toxicology. 92(3):1177-1188, 2018. (査読有)

DOI: 10.1007/s00204-017-2112-9

[学会発表](計15件)

山田悠士郎、藤森惣大、青木重樹、伊藤晃成 「獲得免疫系の活性化に対するケラチノサイトにおける HLA 多型特異的なストレス応答の関与」 日本薬学会 第 139 年会(2019 年 3 月)

青木重樹、伊藤晃成 「HLA トランスジェニックマウスを用いた薬物過敏症のメカニズム研究」 第 1 回 医薬品毒性機序研究会 (2019 年 1 月)

Kenji Watanabe, Shigeki Aoki, Takahiro Goto, Liang Qu, Tyuji Hoshino, Kousei Ito. "In silico structural analysis of HLA complexes associated with idiosyncratic drug toxicities" 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX (2018 年 10 月)

青木重樹 「HLA の関与する薬物副作用の評価とその予測」 第 24 回安全性研究所講演会 (第一三共株式会社)(2018 年 9 月)

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 年 9 月)

渡邊賢治、青木重樹、後藤貴博、瞿良、星野忠次、伊藤晃成 「In silico 手法を利用した特異体質薬物毒性に關与する HLA 多型の構造的解析」 第 25 回 日本免疫毒性学会学術年会 (2018 年 9 月)

青木重樹、薄田健史、藤森惣大、伊藤晃成 「HLA 遺伝子導入マウスを用いたアバカビル過敏症の評価」 第 39 回日本臨床薬理学会学術総会 (2018 年 7 月)

薄田健史、青木重樹、宋彬彬、藤森惣大、伊藤晃成 「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薬物毒性評価モデルの確立」 日本薬学会 第 138 年会 (2018 年 3 月)

Takeshi Susukida, Shigeki Aoki, Kotaro Kogo, Sota Fujimori, Binbin Song, Cong Liu, Shuichi Sekine, Kousei Ito. "Evaluation of Immune-Mediated Idiosyncratic Drug Toxicity Using Chimeric HLA Transgenic Mice." SOT 57th Annual Meeting and ToxExpo (2018 年 3 月)

Shigeki Aoki, Sota Fujimori, Kousei Ito. "In Vitro Analyses of Abacavir-Induced Idiosyncratic Toxicity Using Keratinocytes Derived from Hla-Transgenic Mice." SOT 57th Annual Meeting and ToxExpo (2018 年 3 月)

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」 日本薬物動態学会 第 32 回年会 (2017 年 11 月)

青木重樹、薄田健史、藤森惣大、宋彬彬、伊藤晃成 「免疫の関与する特異体質薬物毒性評価モデルにおけるキメラ型 HLA 遺伝子導入マウスの有用性」 第 24 回 日本免疫毒性学会学術年会 (2017 年 9 月)

藤森惣大、青木重樹、薄田健史、伊藤晃成 「HLA 遺伝子導入マウス由来細胞を用いた皮膚特異的な薬物毒性発症メカニズムの解析」 第 24 回 日本免疫毒性学会学術年会 (2017 年 9 月)

藤森惣大、宋彬彬、薄田健史、青木重樹、伊藤晃成 「HLA 遺伝子導入マウス由来細胞を用いた特異体質薬物毒性メカニズムの解析」 第 44 回 日本毒性学会学術年会 (2017 年 7 月)

渡邊賢治、青木重樹、後藤貴博、瞿良、星野忠次、小阪圭吾、劉聡、久米俊行、伊藤晃成 「HLA の関与する特異体質薬物毒性の予測を目的とした in silico 手法の構築」 日本薬学会 第 137 年会 (2017 年 3 月)

[その他]

ホームページ等

千葉大学大学院薬学研究院生物薬剤学研究室ホームページ

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

千葉大学プレスリリース

<http://www.chiba-u.ac.jp/general/publicity/press/files/2017/20171124yakugaku.pdf>

academist Journal

<https://academist-cf.com/journal/?p=6744>

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。