

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08277

研究課題名(和文)重症薬疹における薬物とHLAの結合様式の解析および重症薬疹治療薬の開発

研究課題名(英文) Analysis of drug-HLA binding structures in severe drug eruptions and development of drugs for severe drug eruptions

研究代表者

渡辺 秀晃 (Watanabe, Hideaki)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：80327931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：薬疹の報告の多い数種の薬剤は芳香族を持ち、その近くに二重結合の酸素を有する共通構造を持ちHLA-B*13:01を持つ人に対して、重症型薬疹を起こすことが予想された。バイカリンが、重症型薬疹SJS/TENにおいて細胞死に関わっているAnnexin A1とFRP1の結合を阻害しRIP1およびRIP3の活性化を阻害することで細胞死を阻害することを見出し、SJSの治療薬の候補となりうることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤を投与する前にHLAを測定することで死亡率の高いSJS/TEN(SJSで4%、TENで30%)の発症を抑える、いわゆるオーダーメイド医療に繋がる。また現在SJS/TENの治療にはステロイド全身投与以外にいい治療法が無いのが現状であるが、漢方薬バイカリンが、SJS/TENにおいて皮膚の細胞死を阻害する可能性を見出し、SJSの治療薬の候補となりうるということがわかり、今後の臨床応用に繋がる研究である。

研究成果の概要(英文)：Several drugs with frequently reported drug eruptions were expected to cause severe drug eruptions in individuals with HLA-B*13:01 due to their common structure with aromatics and a double bonded oxygen near the aromatics.

We found that baicalin inhibits cell death by blocking the binding of Annexin A1 and FRP1, which are involved in cell death in severe drug eruption SJS/TEN, and inhibiting the activation of RIP1 and RIP3, and thus may be a candidate for the treatment of SJS.

研究分野：皮膚科学

キーワード：重症型薬疹 HLA バイカリン Annexin A1 スティーヴンス・ジョンソン症候群 中毒性表皮壊死症 薬剤性過敏症候群

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

スティーヴンス・ジョンソン症候群／中毒性表皮壊死症は予後が悪く、現在ステロイド全身投与以外に効果のある治療が無いのが現状である。また薬剤性過敏症症候群を含めて、重症型薬疹に対する発症予測因子の解明が必要であり、様々な検討がなされている。

2. 研究の目的

(1) 重症型薬疹の一つである「薬剤性過敏症症候群(以下DIHSと言う。)」において、特定のHLAがこの薬疹発症に関与していることが明らかにされている。DIHSは特定の薬剤でのみ発症することが特徴とされ、その中にレクチゾールがある。近年、レクチゾールによるDIHSの発症に、HLA-B*13:01が関与していることが報告された。そこで、レクチゾールは、なぜHLA-B*13:01のアレル型を持つ人にDIHSを発症させ、たった3残基しか違いのないHLA-B*13:02を持つ人にはDIHSを発症させないのかを構造の観点から考察する。その結果、HLA-B*13:01がHLA-B*13:02と比べてレクチゾールと結合親和性が高いという結果が得られた場合、HLA-B*13:01にレクチゾールが結合し、構造変化を引き起こすことでDIHSを発症している可能性が高い。In silicoを用いた結合様式および結合強度の計算を行ったところ、DIHSを引き起こすレクチゾールは、HLA-B*13:02と比較してHLA-B*13:01により強く結合することが明らかにすることが出来た。次に、HLA-B*13:01を持つ人がレクチゾール以外でDIHSを引き起こすとされている、フェノバルビタール、フェニトイン、アロプリノールに対して、DIHSを起こす理由をあきらかにすることが出来れば、どのような薬が薬疹を起こすかを予測することが出来ると考え、フェニトイン、フェノバルビタール、アロプリノールとHLA-B*13:01についても、ドッキング計算を行い、これらの薬物とレクチゾールはなぜHLA-B*13:01に対してDIHSを引き起こすのかについて構造の点から明らかにした。

(2) 重症型薬疹の中毒性表皮壊死症：TEN、Stevens-Johnson症候群：SJSは、細胞内のネクロトーシスが原因で引き起こされることが知られている。ネクロトーシスの発生機構としては、末梢血単球から放出されたAnnexin A1と表皮細胞の受容体(formyl peptide receptor1：FPR1)が結合すると、RIP1およびRIP3が活性化される。MLKLは、活性化されたRIP3によりThr357およびSer358がリン酸化される。リン酸化されたMLKLはオリゴマーを形成して細胞膜と結合し、Na⁺およびCa²⁺を流入させて細胞膜を破壊するきっかけとなる穴を形成し、ネクロトーシスが起るとされている。研究協力者である帝京大学の日下部博士らは、SJS治療薬として、バイカリンが候補になり得ることを明らかにしている。そこで、新規SJS阻害薬の開発を目指し、バイカリンとAnnexin A1の結合様式をin silicoシミュレーション実験で予測し、新たな阻害薬開発の手がかりを得ることを目指した。

3. 研究の方法

(1-1) HLA-B*13:01およびHLA-B*13:02に対して、プログラムModellerを用いて立体構造を予測し、プログラムAutoDock vinaを用いて、レクチゾールとHLA-B*13:01およびHLA-B*13:02に対してドッキングシミュレーションを行った。その後、プログラムAmberToolsを用いてMD計算およびMM-GBSA法を用いた結合エネルギーを計算した。

(1-2) (1-1)で構築したHLA-B*13:01に対して、プログラムAutoDock vinaを用いてフェノバルビタール、フェニトイン、アロプリノールとHLA-B*13:01およびHLA-B*13:02に対してドッキングシミュレーションを行った。その後、プログラムAmberToolsを用いてMD計算およびMM-GBSA法を用いた結合エネルギーを計算した。

(2) Annexin A1およびFRP1の立体構造を、プログラムAlphaFoldを用いて予測した。Annexin A1とバイカリンの結合様式をプログラムAutoDock vinaを用いて明らかにした。

4. 研究成果

(1-1) HLA-B*13:01およびHLA-B*13:02の立体構造モデルを構築し、構造を比較した結果、HLA-B*13:01では94番、95番がイソロイシン、97番がアルギニンであるのに対し、HLA-B*13:02では94番がスレオニン、95番に側鎖が大きいトリプトファン、97番がスレオニンになっている(図1)。

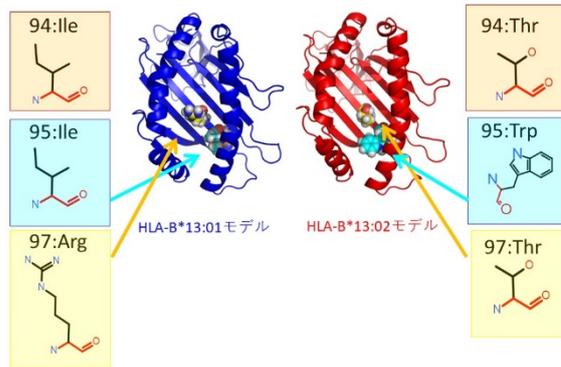


図1 HLA-B*13:01とHLA-B*13:02の構造比較

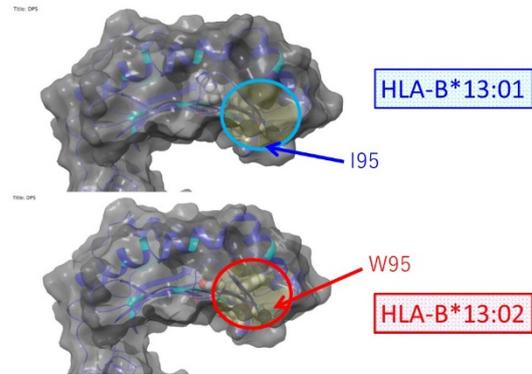


図2 HLA-B*13:01に存在するサブポケット構造

これら差がある3残基を中心に立体構造を比較した結果、HLA-B*13:01では、異なる3残基付近にHLA-B*13:02と比べ大きくくぼみ、サブポケットがあることがわかった。HLA-B*13:02では、95番が側鎖の大きいトリプトファンで、サブポケットの下部に位置しているためサブポケットを埋めて空隙を小さくしているのに対し、HLA-B*13:01の95番は側鎖が小さいイソロイシンであることからサブポケットを埋めることがないため、HLA-B*13:01において、HLA-B*13:02に存在しないサブポケットを明らかにすることができた(図2)。次にHLA-B*13:01およびHLA-B*13:02とレクチゾールをプログラムAutoDock vinaを用いてDocking計算を行い、結合様式を比較した結果、HLA-B*13:01とHLA-B*13:02において、レクチゾールの結合する位置が大きく異なっていることが分かった(図3)。HLA-B*13:01では、構造比較から発見したHLA-B*13:02に存在せず、HLA-B*13:01のみに存在するサブポケットを利用してレクチゾールが結合していることがわかった。また、結合の強さを数値化するためにMM-GBSA法を用いた結合エネルギー計算を行った結果、HLA-B*13:02に比べて、HLA-B*13:01では -10 kcal/molほど低いことから、エネルギー的にHLA-B*13:01とレクチゾールは、HLA-B*13:02よりも極めて強く結合しそうなことが示唆された。このことからHLA-B*13:01のようにサブポケットが存在するとそこに薬物が結合してしまい、それによりペプチド結合部位に構造変化が起こることでDIHSを引き起こされることが示唆された。

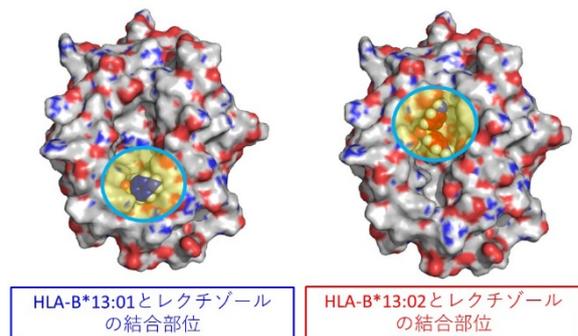


図3 HLA-B*13:01とHLA-B*13:02に対するレクチゾール結合部位

(1-2) (1-1)で構築したHLA-B*13:01の立体構造に対し、プログラムAutoDock vinaを用いてフェノバルビタール、フェニトイン、アロプリノールとHLA-B*13:01およびHLA-B*13:02に対してドッキングシミュレーションを行った。ドッキングシミュレーションの結果、フェノバルビタール、フェニトイン、アロプリノールとHLA-B*13:01の結合部位はレクチゾールのHLA-B*13:01への結合部位と全く同じ結合部位であった(図4)。

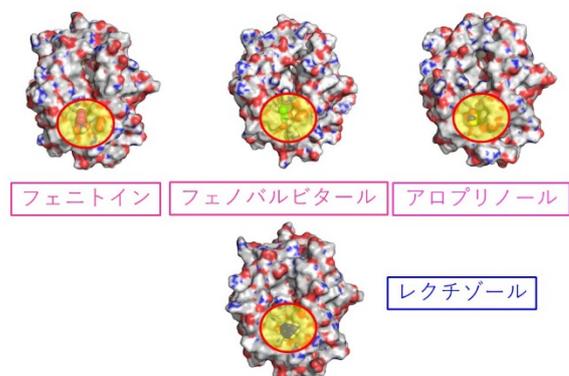


図4 HLA-B*13:01とDIHSを引き起こす薬物の結合部位

結合部位を詳細に観察すると、フェノバルビタールの芳香族環部分は、HLA-B*13:02には存在せずHLA-B*13:01のみに存在する疎水ポケットに結合し、カルボニル基の酸素が147番のトリプトファンと相互作用していることがわかった(図5)。フェニトインもフェノバルビタールと同様に、芳香族環が疎水ポケットに結合しカルボニルの酸素がW147と相互作用していることがわかった(図6)。アロ

プリノールも同様に、芳香族環が疎水ポケットに結合しカルボニルの酸素が W147 と相互作用していることがわかった (図 7)。以上の結果から興味深い共通点を見つけることができた。レクチゾール、フェノバルビタール、フェニトイン、アロプリノールすべてに芳香族環を持ち、疎水性のサブポケットに結合している。また、その芳香族環近くにカルボニル基 (二重結合の酸素) を持っていて、この酸素と W147 が結合していた。このことから、芳香族を持っていて、その近く二重結合の酸素を有する共通構造を持つ薬物は HLA-B*13:01 を持つ人に対して、DIHS を起こすことが予想される。

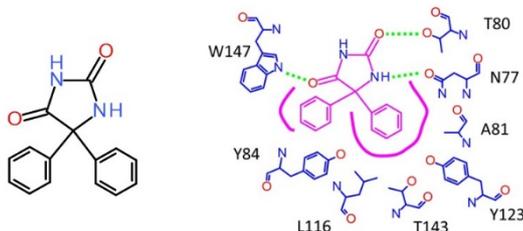


図5 HLA-B*13:01とフェニトインの結合部位

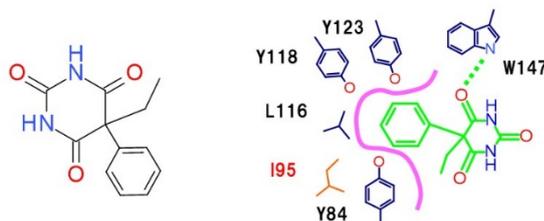


図6 HLA-B*13:01とフェノバルビタールの結合部位

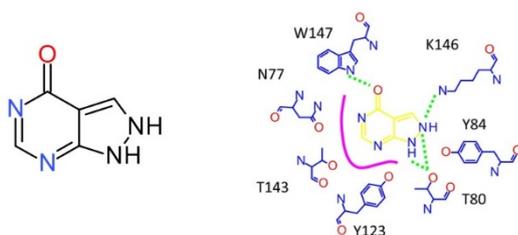


図7 HLA-B*13:01とアロプリノールの結合部位

(2) 研究協力者である帝京大学薬学部の日下部博士は、バイカリンの標的タンパク質の一つとして Annexin A1 が含まれることを明らかにしている。そこで、日下部博士と協力し、Annexin A1 とバイカリンの結合様式を明らかにした。Annexin A1 に関しては、プログラム AlphaFold を用いて全長の立体構造を明らかにし、その後、その構造を用いて、ドッキングプログラム AutoDock vina を用いて結合様式を明らかにした。その結果、バイカリンは、Annexin A1 の N 末端ドメインと C 末端コアドメインを結びつける働きをしていることを明らかにした。その後、FPR1 の Annexin A1 の結合様式を明らかにするために、AlphaFold を用いて、FPR1 の立体構造を予測し、構造について考察した結果、FPR1 の中央には、ペプチド結合ポアが存在し、Annexin A1 の N 末端ドメインが、FPR1 のペプチド結合ポアに入り込むことが予想された。Annexin A1 の N 末端ドメインは、C 末端コアドメインから離れ、FRP1 のペプチド結合ポアにはまり込むことによって RIP1 および RIP3 を活性化し、ネクロプトーシスにつながることを示唆される。以上のことから、バイカリンのように、Annexin A1 の N 末端ドメインと C 末端コアドメインの結びつきを止める化合物は、Annexin A1 と FRP1 の結合を阻害し、RIP1 および RIP3 の活性化を阻害することでネクロプトーシスを阻害し、SJS の治療薬となりうることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tashiro Y, Azukizawa H, Asada H, Niihara H, Morita E, Yamauchi T, Mizukawa Y, Kusakabe Y, Numazawa S, Izumi M, Sueki H, Watanabe H.	4. 巻 46
2. 論文標題 Drug-induced hypersensitivity syndrome/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms due to lamotrigine differs from that due to other drugs.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol	6. 最初と最後の頁 226-233
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.14776.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tashiro Y, Azukizawa H, Asada H, Niihara H, Morita E, Yamauchi T, Mizukawa Y, Kusakabe Y, Numazawa S, Izumi M, Sueki H, Watanabe H.	4. 巻 46
2. 論文標題 Drug-induced hypersensitivity syndrome/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms due to lamotrigine differs from that due to other drugs.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 226-233
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.14776.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺秀晃
2. 発表標題 重症薬疹における遺伝的背景
3. 学会等名 第48回日本皮膚免疫アレルギー学会総会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡辺秀晃
2. 発表標題 重症薬疹のトピックス（臨床）
3. 学会等名 第117回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡辺秀晃
2. 発表標題 スティーヴンス・ジョンソン症候群 (SJS) . 中毒性表皮壊死症 (TEN) - 診断と治療 - .
3. 学会等名 第70回日本皮膚西部支部学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------