

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19278

研究課題名（和文）HLA分子を介した免疫系を攪乱する薬物の新規同定法の開発

研究課題名（英文）New method for identification of HLA-mediated immunomodulatory drugs

研究代表者

前仲 勝実（Maenaka, Katsumi）

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：10322752

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：人類共通のHLA-Gを例として、代表者等が構築したHLAタンパク質を用いたスクリーニング法により実施した既存薬スクリーニングの結果を受けて、疾患との関連が予想できる結合候補薬剤に着目した。この結合候補薬剤についてin vitroで調製したHLA-Gとの複合体を用いた質量分析法による解析により、候補薬剤とHLA-Gタンパク質との結合を実証することに成功した。

他方、薬剤過敏症と関連するHLAと薬剤の結合や提示されるペプチドパターンの変化が分子レベルで明らかにされている抗HIV薬・アバカビルとHLA-B*57:01多型について、我々のスクリーニング法を適用したところ、両者の結合を示唆する成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HLA分子を介して薬剤副作用を誘発する薬物を見出すための本研究のアプローチは、従来のコホート研究と異なって全く新しい試みであり、これまで、早期発見・対処しか手の施しようがなかった薬剤過敏症候群に対して有効な予防の指針を与えると期待できる。代表者等が構築したスクリーニング方法により、薬剤過敏症と関連するHLAと薬剤の結合等が既に明らかにされている抗HIV薬・アバカビルとHLA-B*57:01との結合が判定できたことや他のHLAにて複数の結合候補薬剤を判別できたことは非常に意義深い。本スクリーニング法を最適化し汎用性を高めることで、創薬における安全性評価に貢献し、幅広く波及する成果となりうる。

研究成果の概要（英文）：Using HLA-G, commonly exists in human, as an example, we focused on binding candidate drugs that can be predicted to be associated with disease, based on the results of the FDA-approved drug screening performed by a screening method using HLA proteins developed by ourselves. We then prepared a putative complex of HLA-G and binding candidate drug in vitro and performed mass spectroscopy. The analyzed result demonstrated the binding between the candidate drug and the HLA-G protein.

On the other hand, we focused the anti-HIV drug, abacavir, and the HLA-B * 57: 01 polymorphism, in which the binding of HLA and drugs associated with drug hypersensitivity and changes in the presented peptide pattern have been elucidated at the molecular level. When our screening method was applied to HLA-B*57:01 and abacavir, we can determine the binding of abacavir to HLA-B57, suggesting the possibility of developing into a universal and versatile method.

研究分野：構造生物学

キーワード：HLA 薬剤副作用 免疫応答 薬剤過敏症 タンパク質 スクリーニング 創薬

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト主要組織適合性抗原(MHC)であるヒト白血球抗原(HLA, Human Leukocyte Antigen)は、細胞表面に発現し免疫応答を担う重要な分子である。HLA クラス I 分子は細胞内のプロテアソームにより分解されてきたペプチド抗原を細胞表面に提示し、免疫細胞がこれを認識することで、自己と非自己を識別する。HLA クラス I 分子は類似した立体構造を有しており、その構造は重鎖、ミクログロブリン、ペプチドで構成される複合体分子である。ペプチド抗原は重鎖の 1-2 ドメインからなるペプチド収容溝に提示される。

近年、薬剤による副作用と HLA 分子の多型との関連性が注目されている(1)。代表例として、抗 HIV 薬・アバカビル服用による薬剤過敏症の発症と HLA-B*57:01 多型に相関が認められている。アバカビルの例では、質量分析および結晶構造解析の結果、薬剤がペプチド収容溝に結合することで提示されるペプチドのパターンが変わることにより異常な免疫応答が誘導されると考えられている(2,3) (図 1)。アバカビルの他にも、薬剤服用による過敏症症候群と特定の型の HLA との相関が複数報告されているが、いずれも HLA が薬剤の結合等により通常とは異なるペプチドを提示するため、異常な非自己として免疫反応を引き起こすことが原因と考えられている。この他に、特定の型の HLA 保有者でのみ低分子薬による副作用リスクが増大するという報告があり、これまでのコホート研究からいくつか薬剤が特定されている。しかし、薬剤と HLA 多型との関連性を事前に予測できる評価試験方法は未だ確立されていない。その理由として、HLA 分子と結合し得る薬物が、ペプチド収容溝に安定的に収容され得ない可能性や、さらに大規模な集団と長期にわたる観察を必要とするコホート研究には手間と時間を要すると考えられてきたことから、HLA と薬物の相互作用を迅速かつ簡便に判定することは困難であると考えられてきた。

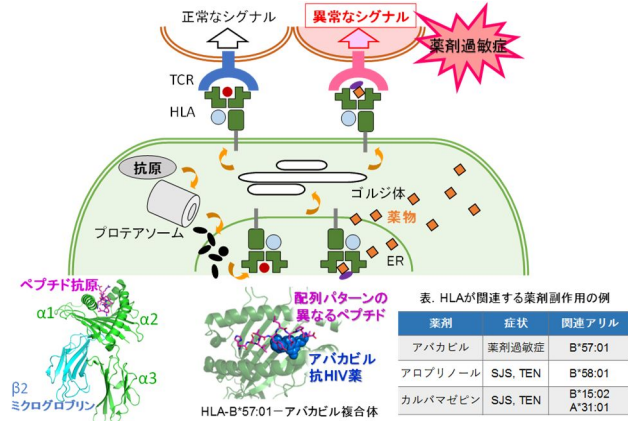


図 1. HLA 分子の関与が示唆される副作用

2. 研究の目的

本申請では、HLA と相互作用する物質を迅速かつ簡便に判別するためのスクリーニング方法を開発し、薬剤と HLA 分子の未知の相互作用を明らかにすること、それにより惹起される異常な免疫応答の分子機構を理解することを目的とする。本手法が確立されれば、特定の HLA 多型を保有する者に対する薬物副作用が予め排除できるため、安全な薬剤の開発に向けて新たな指針を与える成果となりうる。本研究の成果により、薬剤過敏症症候群の素因となりうる薬剤についてその分子機構の理解が進むことが期待され、確立を目指すスクリーニング手法は、投薬による副作用の予防を創薬・臨床の両ステージで可能にするだけでなく、安全な化粧品等の医薬部外品の開発にも貢献できるなど、学術的にも社会的にも幅広い貢献が期待できる。

3. 研究の方法

本研究では、以下の項目について取り組む。全人類に共通し多型が少ない HLA-G を代表例として、化合物スクリーニングを実施し、結合候補化合物について、物理化学的解析及び構造生物学的手法から分子基盤を解明する。更に、異なる HLA 分子を用いて系の最適化を図り、スクリーニング方法の汎用性を検証することとした。

本スクリーニングは具体的に以下の (i) HLA-G 蛋白質からペプチド抗原を解離させる工程、(ii) 化合物を加え HLA-G と結合させる工程、(iii) HLA-G と化合物の結合を実験的に測定し判定する工程の 3 工程からなる。研究代表者は本学所有の 1,600 からなる既存薬ライブラリーを用いたスクリーニングにより、HLA-G と結合する候補化合物を特定する。次いで、選別された候補薬剤と HLA-G の分子認識機構を物理化学解析により明らかにする。更に、HLA-G 以外の HLA 分子について同様の工程でスクリーニングが可能か検証する。具体的には、アバカビルと HLA-B*57:01 のように薬剤過敏症との関連が報告されている例を用いてスクリーニングを実施し、薬剤が本手法により特定されるかを検証する。様々な HLA 分子に対するスクリーニング系の汎用性が高いことが明らかになれば、薬剤による副作用の予防に大いに貢献できる。また、本判別法のボトルネックの一つである組換え HLA 分子、および抗原が解離した状態の組換え HLA 分子の調製について、改変 HLA-G を調製する、調製条件の検討をするなどして、更なる判別方法の最適化を図る。手法の最適化が進めば多様な HLA 分子に対して相互作用する薬剤を迅速に判別することが可能となる。

4. 研究成果

本研究では、HLA 分子を介して異常な免疫応答を誘発する薬物の簡便で迅速なスクリーニング方法を確立し、薬剤服用による過敏症症候群の発症と固有の HLA 多型との相関についての知見を得ることだけでなく将来的な予防の観点から創薬・臨床に貢献することを目指している。

我々が構築したスクリーニング法を、本学所有の1,600からなる既存薬ライブラリーを用いたスクリーニングにより、HLA-Gと結合する26の候補化合物を得た。26の候補化合物には様々な構造の化合物が見られ、薬効や分子量にも共通性は見られなかった。これらのうち、疾患との関連が予想できる一つの結合候補薬剤に着目した。

この薬剤について *in vitro* でのHLA-Gタンパク質を用いた巻き戻しにより、結合候補薬剤との複合体と考えられる分子を調製した(図2;矢印の画分)。これらを前処理して得られた低分子を含む画分について、質量分析法による解析を進めた。その結果、候補薬剤がHLA-Gタンパク質と結合していることを実証することに成功した(図3)。

次に、我々が確立したスクリーニング法の汎用性を検証するため、最も研究が進んでおり、薬剤過敏症と関連するHLAと薬剤の結合や提示されるペプチドパターンの変化が分子レベルで明らかにされているアバカビルとHLA-B*57:01多型の組合せを検証することとした。我々のスクリーニング法をHLA-B*57:01に適用したところ、コントロールとして用いたDMSO群とは異なり、抗原ペプチド群と同じような挙動を示したことから、HLA-B*57:01とアバカビルの結合を示唆する成果を得た。この結果は、実際に免疫を惹起して薬剤過敏症を誘発する薬剤とHLAとの相互作用を本スクリーニング法により判別しうることを示す。

最後に、本スクリーニング法のボトルネックの一つである組換えHLAタンパク質、および抗原が解離した状態のHLAタンパク質の調製について簡便化できないか検討した。具体的には、HLAクラスI分子に共通のペプチド結合溝を構成するポケットの一端にジスルフィド結合を形成するようなシステイン変異を導入し、安定化させることでHLAタンパク質の生産効率化を図った。また、抗原ペプチドを加えずにHLAを調製する時に、ジペプチドを用いることで、ペプチド結合溝を一時的に安定化することで調製効率が改善するか検討した。ペプチド収容溝へのジスルフィド結合の導入、ジペプチドを用いた調製法により収率の向上や抗原ペプチドを持たないHLAを調製した例が他のHLAクラスI分子で報告されている(4,5)(図4)。

HLA-B*57:01にシステイン変異を導入した場合には、野生型と比べて調製効率が数倍程度まで向上することが示唆された。一方、システイン変異体とジペプチドを用いた場合には抗原ペプチドを用いずとも組換えタンパク質が調製できることが示唆された。

以上より、種々のHLAについて本スクリーニング法により相互作用する薬剤の特定が可能であることを明らかにした。また、本手法において煩雑な操作を要するHLAの調製や抗原ペプチドの解離操作を簡略化することが期待できる成果を得た。このように、本研究をとおして、我々が確立した手法をより広い汎用性を持った形に発展できる可能性を見出した。

<引用文献>

1. Bharadwaj, M., Illing, P., Theodossis, A., Purcell, A., Rossjohn, J., McCluskey, J., Insel, P., Amara, S., and Blaschke, T. (2012) Drug Hypersensitivity and Human Leukocyte Antigens of the Major Histocompatibility Complex. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol 52 52, 401-31
2. Illing, P., Vivian, J., Dudek, N., Kostenko, L., Chen, Z., Bharadwaj, M., Miles, J., Kjer-Nielsen, L., Gras, S., Williamson, N., Burrows, S., Purcell, A., Rossjohn, J., and McCluskey, J. (2012) Immune self-reactivity triggered by drug-modified HLA-peptide repertoire. *Nature* 486, 554-U158
3. Ostrov, D., Grant, B., Pompeu, Y., Sidney, J., Harndahl, M., Southwood, S., Oseroff, C., Lu, S., Jakoncic, J., de Oliveira, C., Yang, L., Mei, H., Shi, L., Shabanowitz, J., English, A., Wriston, A., Lucas, A., Phillips, E., Mallal, S., Grey, H., Sette, A., Hunt, D., Buus, S., and Peters, B. (2012) Drug hypersensitivity caused by alteration of the MHC-presented self-peptide repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 9959-9964

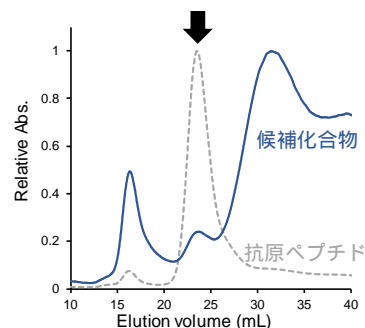


図2. 候補薬剤 - HLA-G 複合体の調製

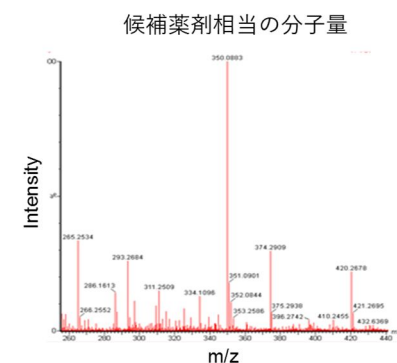


図3. 質量分析による候補薬剤の同定

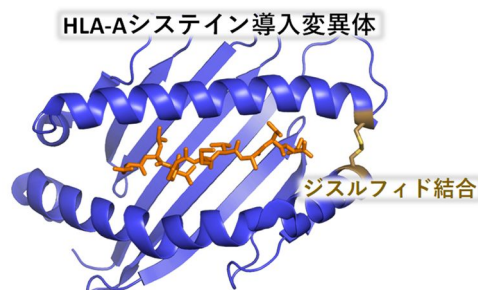


図4. ジスルフィド結合を導入したHLAの例

4. Saini, S. K., Tamhane, T., Anjanappa, R., Saikia, A., Ramskov, S., Donia, M., Svane, I. M., Jakobsen, S. N., Garcia-Alai, M., Zacharias, M., Meijers, R., Springer, S., and Hadrup, S. R. (2019) Empty peptide-receptive MHC class I molecules for efficient detection of antigen-specific T cells. *Sci Immunol* **4**
5. Saini, S. K., Ostermeir, K., Ramnarayan, V. R., Schuster, H., Zacharias, M., and Springer, S. (2013) Dipeptides promote folding and peptide binding of MHC class I molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 15383-15388

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 山田沙耶、可野 巧、田所 高志、市川 聡、松田 彰、野村 尚生、黒木 喜美子、前仲 勝実
2. 発表標題 HLA 分子と相互作用する薬剤の新規判別法の確立
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第13回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田沙耶、可野巧、田所高志、市川聡、松田彰、野村尚生、黒木喜美子、前仲勝実
2. 発表標題 HLA分子と相互作用する薬剤の新規判別法の確立
3. 学会等名 第5回北海道大学部局横断シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前仲勝実
2. 発表標題 HLA分子を介して副作用を誘発する薬物の新規同定法の開発
3. 学会等名 2019年度JST新技術説明会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://convallaria.pharm.hokudai.ac.jp/bunshi/>
<https://www.facebook.com/bunshi.hokudai/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----