

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：13201
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2023
課題番号：21K15311
研究課題名（和文）薬疹モデルマウスを用いた薬物過敏症の個人差を生み出す細胞内代謝環境の重要性評価

研究課題名（英文）Evaluation of the importance of intracellular metabolism in individual differences in drug hypersensitivity using a mouse model of cutaneous adverse drug reaction

研究代表者
薄田 健史（Susukida, Takeshi）
富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：50880689
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：薬物過敏症の個人差は遺伝的要因と環境要因に関連することが知られているが、遺伝的要因であるヒト白血球抗原(HLA)多型のみを考慮した場合、リスク薬物を完全に予測できないことが問題となっている。本研究では、抗HIV薬アバカビルによる薬物過敏症を評価可能な薬疹モデルマウスを用いて、薬物過敏症発症時にCD8陽性T細胞においてHk2の発現が上昇し、解糖系代謝が亢進することを明らかにした。加えて、解糖系代謝阻害剤の投与によって薬物過敏症発症が抑制されることを示した。さらに、食事によるカロリー制限によってCD8陽性T細胞の解糖系代謝が低下した場合においても薬物過敏症の発症が抑制されることも示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって薬物過敏症の個人差を生み出す免疫細胞内のエネルギー代謝環境の重要性が実証された。さらに、食事内容によって生体での栄養状態が異なる場合においても薬物過敏症発症の大小が決定づけられることが明らかとなり、食生活の違いが発症環境要因に位置付けられる可能性も示された。今後のさらなる研究の発展によって薬物過敏症の発症リスクの高い集団をより正確に見極められるようになることで、より安全な個別化医療の提供が実現可能となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Drug hypersensitivity associated with specific human leukocyte antigen (HLA) allotype does not occur in all subjects of a given HLA model population, suggesting the difficulties to predict the onset risk without considering additional factors. In this study, we demonstrated that the expression level of Hk2 and glycolysis level in CD8+ T cells was upregulated in our mouse model of cutaneous adverse drug reaction. In addition, glycolysis inhibition by either glycolysis inhibitor treatment or dietary calorie restriction resulted in attenuation of drug hypersensitivity.

研究分野：医薬品安全性学

キーワード：薬物過敏症 HLA CD8陽性T細胞 細胞内エネルギー代謝 解糖系

1. 研究開始当初の背景

医薬品による副作用にはある特定の体質(遺伝子)・環境により現れる個人差(特異体質性)が存在する。特異体質性の薬物過敏症は臨床上無視できない有害事象として知られている一方で、その発症頻度は極めて低く、現在の前臨床試験ではリスク予測が困難である。また、その発症リスクへのヒト白血球抗原(HLA)多型の関与がゲノムワイド関連解析により近年見出されたものの、その陽性的中率が100%でないことから、リスク薬物を遺伝的要因だけでは完全に予測しきれないことが問題となっている。

薬物過敏症の発症メカニズムを前向きかつ詳細に解明するため、抗 HIV 薬アバカビル(ABC)と相互作用するヒト-マウスキメラ型 HLA-B*57:01 多型を導入したトランスジェニックマウス(B*57:01-Tg)をこれまでに作出し、HLA 多型との相互作用による免疫応答を起因とする薬物過敏症を解析可能な薬疹モデルマウスとして有用であることを示した。その一方で腫瘍免疫学分野では、免疫応答の大小を決定づける免疫細胞の機能制御と細胞内エネルギー代謝との関連が近年多く報告されている。

これらの学術的背景から、「免疫細胞内の細胞内代謝環境の違いが薬物過敏症発症の個人差を生み出しているのではないか？」と考え、薬物過敏症の個人差を左右する細胞内代謝環境の重要性について薬疹モデルマウスを用いて検証することを着想した。

2. 研究の目的

B*57:01-Tg モデルマウスを用いて、薬物過敏症(ABC 過敏症)の発症機序に関与する CD8⁺ T 細胞におけるエネルギー代謝経路とその制御機構の詳細を明らかにすることで、薬物過敏症の発症環境因子に「細胞内エネルギー代謝環境の違い」が位置付けられるか実証することを第一の目的とする。理論的な裏付けを得た後、後半では、食事による細胞内代謝環境変化の違いによって、実際に薬物過敏症の発症リスクが左右されるか検証することを第二の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物の飼育と遺伝子型の判定

HLA-B*57:01 遺伝子導入マウス(B*57:01-Tg)の維持および繁殖は富山大学内の実験動物飼育室において行い、富山大学動物実験委員会の承認の下、実施した。遺伝子型の判定については、抽出したゲノムに対して、導入キメラ型 HLA 遺伝子の一部を増幅可能な以下のプライマーセットを用いて半定量的 PCR 反応を行い、アガロース電気泳動結果を基に判定した。chimeric HLA forward, 5' -GAG CTA CTC TCA GGC TGC GTG-3' , and reverse, 5' -CAT GTT AGC AGA CTT CCT CTG CC-3'

(2) 薬物投与

B*57:01-Tg および野生型同腹子マウス(LM)に ABC を 1% (w/w)濃度となるように混合した混餌もしくは Vehicle(飼料のみ)を 7 日間経口投与し、エンドポイントでの頭頸部および耳介リンパ節・血液・耳介皮膚組織を検討に用いた。CD8⁺ T 細胞は物理的破碎・溶血処理したリンパ節から MojoSort™ mouse CD8 T cell Isolation Kit を用いて単離した。なお、ABC 投与開始日を day 0 としたときの day -3 と day 1 にマウス抗 CD4 抗体を 2 回腹腔内投与することで各マウスの CD4⁺ T 細胞を除去した。

2-DG(ヘキソキナーゼ(Hk)阻害剤)については day 0, 3, 6 に 10 mg/body となるように腹腔内投与した。カロリー制限群マウスについては 40% カロリー制限食を 2 週間給餌することで馴化させ、その後同じ飼料を用いて調製した ABC 混餌を 1 週間経口投与した。

(3) CD8⁺ T 細胞の解糖系速度測定

(2) のマウスから単離した CD8⁺ T 細胞を Poly-D-Lysine でコートした XFe24 用のプレートに 5×10^5 cells/well で播種した。 Seahorse XFe24 XF Glycolytic Rate Assay kit を各細胞に添加し、XFe24 Extracellular Flux analyzer を用いて解糖系速度 (GlycoPER) を算出した。

(4) CD8⁺ T 細胞における解糖系酵素遺伝子の発現確認

(2) のマウスから単離した CD8⁺ T 細胞から RNA を単離し、逆転写により cDNA を作製した。以下のプライマーセットを使用したリアルタイム PCR 反応により、解糖系酵素遺伝子発現を Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System を用いて定量した。

Hk2: forward, 5' - ATT GTG GCT GTG GTG AA -3' , and reverse, 5' - AAT GTG ACG CAT CTC CTC-3'

Pfkp: forward, 5' -GGT ACA GAT TCA GCC CTG CAC C-3' , and reverse, 5' -GTC GGC ACC GCA AGT CAA GG-3'

Pkm2: forward, 5' -TGT CTG GAG AAA CAG CCA AG-3' , and reverse, 5' -CGA ATA GCT GCA AGT GGT AGA-3'

(5) CD8⁺ T 細胞内の解糖系代謝産物の測定

(2) のマウスから取得した CD8⁺ T 細胞をメタノール処理・PVDF スピニングにより除タンパクし、さらに MonoSpin C18 column を用いて除脂質した。エバポレーションした各サンプルを蒸留水に再溶解し、Dionex ICS-5000+Q-Exactive を用いて細胞内解糖系代謝産物量を測定した。なお、内部標準物質は Hippuric acid-d5 を使用した。

(6) 活性化 CD8⁺ T 細胞の評価

薬疹発症をもたらす活性化 CD8⁺ T 細胞についてはエフェクター CD8⁺ T 細胞 (CD44^{high}CD62L^{low}CD8⁺ T 細胞) および IFN- γ 産生 CD8⁺ T 細胞の割合により評価した。(2) で取得した CD8⁺ T 細胞の表面抗原および細胞内 IFN- γ を各種標識抗体で染色後、FACS Canto II を用いたフローサイトメトリー解析により活性化 CD8⁺ T 細胞を分離・検出した。IFN- γ の染色実験では、単離 CD8⁺ T 細胞を予め PMA, ionomycin 含有培地で 4 時間再刺激した。

(7) 薬疹評価 (血漿中のバイオマーカー測定)

(2) のマウスから取得した血漿を 1,500 \times g で 15 分間冷却遠心し、その上清について Mouse CCL17/TARC Quantikine enzyme-linked immunosorbent assay kit を用いて thymus and activation-regulated chemokine (TARC) を定量した。

(8) 薬疹評価 (耳介皮膚組織における CD8⁺ T 細胞浸潤)

(2) のマウスから取得した耳介皮膚組織を O.C.T. compound に包埋、急速凍結した後、5 μ m の薄切をクリオスタットで作製した。アセトン固定を行った切片に対し CD8 の蛍光免疫染色を実施し、CD8⁺ T 細胞の皮膚組織内浸潤を蛍光顕微鏡 BZ-X810 を用いた観察から評価した。

4. 研究成果

(1) 薬疹モデルマウスにおける CD8⁺ T 細胞の解糖系代謝の変化

本研究ではまず、薬疹発症 B*57:01-Tg マウスの CD8⁺ T 細胞における解糖系代謝の変化を確認した。ABC 混餌を 1 週間経口投与した B*57:01-Tg マウスの CD8⁺ T 細胞においては、解糖系速度を表す GlycoPER が Vehicle 投与群や LM (野生型同腹子) マウスと比較して有意に増加していた (図 1)。また、CD8⁺ T 細胞における解糖系代謝の律速酵素である *Hk2*, *Pfkp*, *Pkm2* の mRNA 発現量を測定したところ、ABC 投与 B*57:01-Tg マウスにおいて *Hk2* のみ Vehicle 投与群と比較して有意な発現増加が認められた (図 2)。

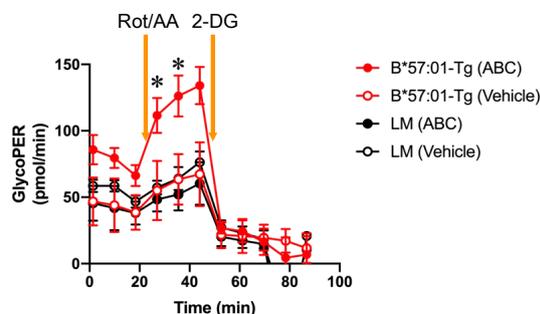


図 1 | 薬疹発症時における CD8⁺ T 細胞の解糖系速度の変化

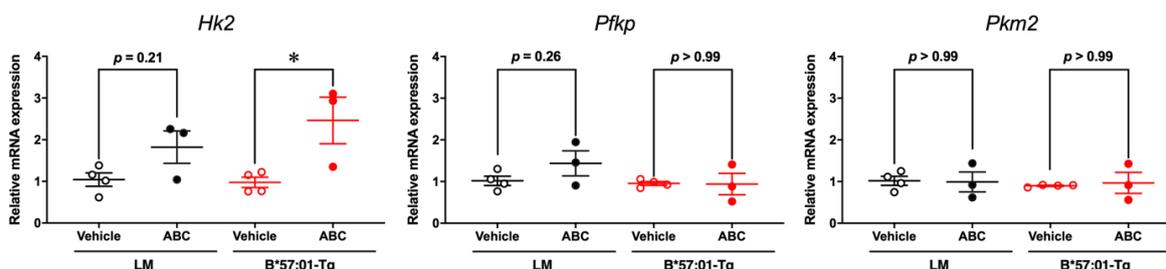


図 2 | 薬疹モデルマウスの CD8⁺ T 細胞における解糖系酵素遺伝子発現の変化

さらに、CD8⁺ T 細胞内の解糖系代謝産物を IC-MS を用いて測定したところ、ABC 投与 B*57:01-Tg マウスにおいて中間体 Fructose 6-phosphate (F6P) および最終産物 Pyruvic acid の産生量が ABC 投与 LM マウスと比較して有意に増加していた (図 3)。加えて、ABC 投与 B*57:01-Tg マウスの CD8⁺ T 細胞では、クエン酸回路の代謝産物である Isocitric acid やペントースリン酸経路の代謝産物も有意に増加していた。

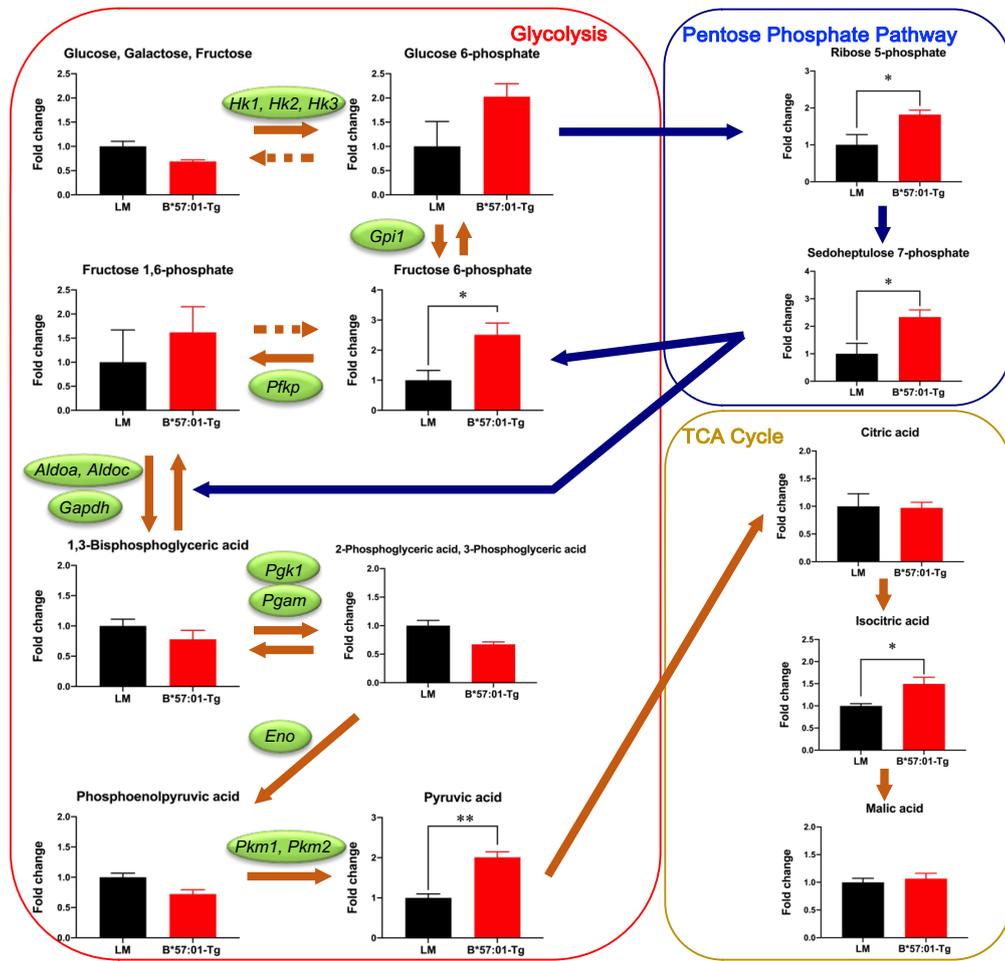


図 3 | 薬疹モデルマウスのCD8⁺T細胞内における解糖系代謝産物量の変化

以上の結果から、薬物過敏症発症時に CD8⁺T 細胞において *Hk2* の発現が上昇し、解糖系代謝が亢進することが示唆された。

(2) 解糖系代謝阻害による薬疹発症の変化

次に、(1) で発現亢進が見出された *Hk2* (ヘキソキナーゼ 2) を 2-DG 投与により阻害した条件で、B*57:01-Tg マウスにおいて薬疹発症が実際に抑制されるか検証した。マウスのリンパ節中のエフェクター CD8⁺T 細胞 (CD44^{high}CD62L^{low}CD8⁺T 細胞; 活性化 T 細胞) の割合を測定したところ、ABC 投与 B*57:01-Tg マウスにおいて LM マウスと比較して有意な増加が認められた一方で、2-DG 投与条件においては増加が認められなかった (図 4a)。同様に IFN- γ 産生 CD8⁺T 細胞の割合についても 2-DG 投与条件においては増加が認められなかった (図 4b)。さらに、皮膚

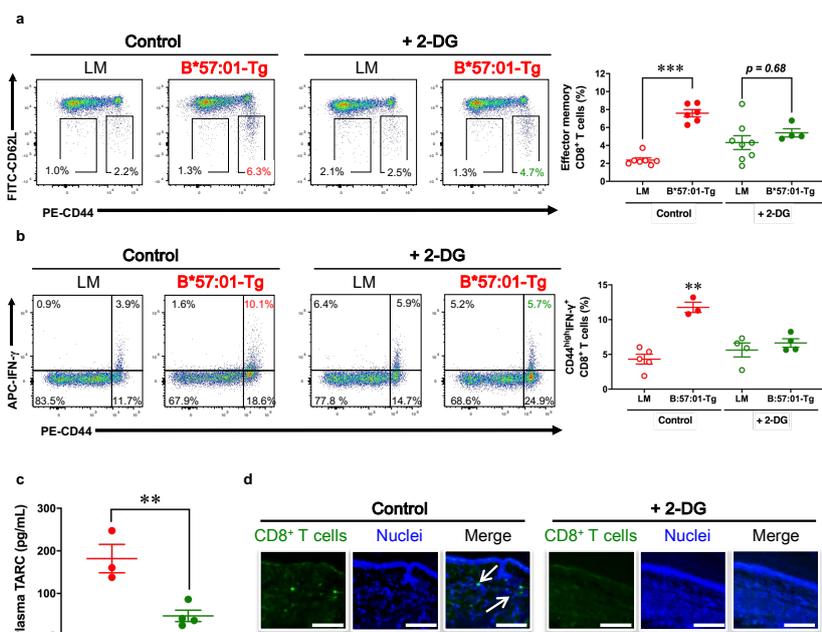


図 4 | Hk2阻害条件B*57:01-Tg マウスにおける薬疹発症の評価

炎のバイオマーカーである血漿中の TARC 量も 2-DG 投与条件ではコントロールと比較して有意に減少し (図 4c)、皮膚組織への CD8⁺T 細胞の浸潤も認められなかった (図 4d)。以上の結果から、解糖系代謝を阻害した B*57:01-Tg マウスでは、薬疹発症が抑制されることが示唆され、薬物過敏症発症における CD8⁺T 細胞内の解糖系代謝の重要性が示された。

(3) カロリー制限による薬疹発症の変化

最後に、より生理的な状態に近い環境をマウスモデルで再現するため、食事内容の変化によって薬疹モデルマウスの解糖系代謝を変動させた条件を検討した。具体的にはヒトでのヴィーガン食に近い40%カロリー制限食をABC投与B*57:01-Tgマウスに給餌し、薬疹発症の変化を検証した。

まずカロリー制限によってCD8⁺T細胞における解糖系代謝が実際に抑制されているか確認したところ、カロリー制限食を給餌した群ではCD8⁺T細胞における解糖系速度が通常食給餌群と比較して有意に低下していた(図5a)。加えて細胞内解糖系代謝最終産物Pyruvic acidの産生量が通常食給餌群と比較して顕著に低下していた(図5b)。

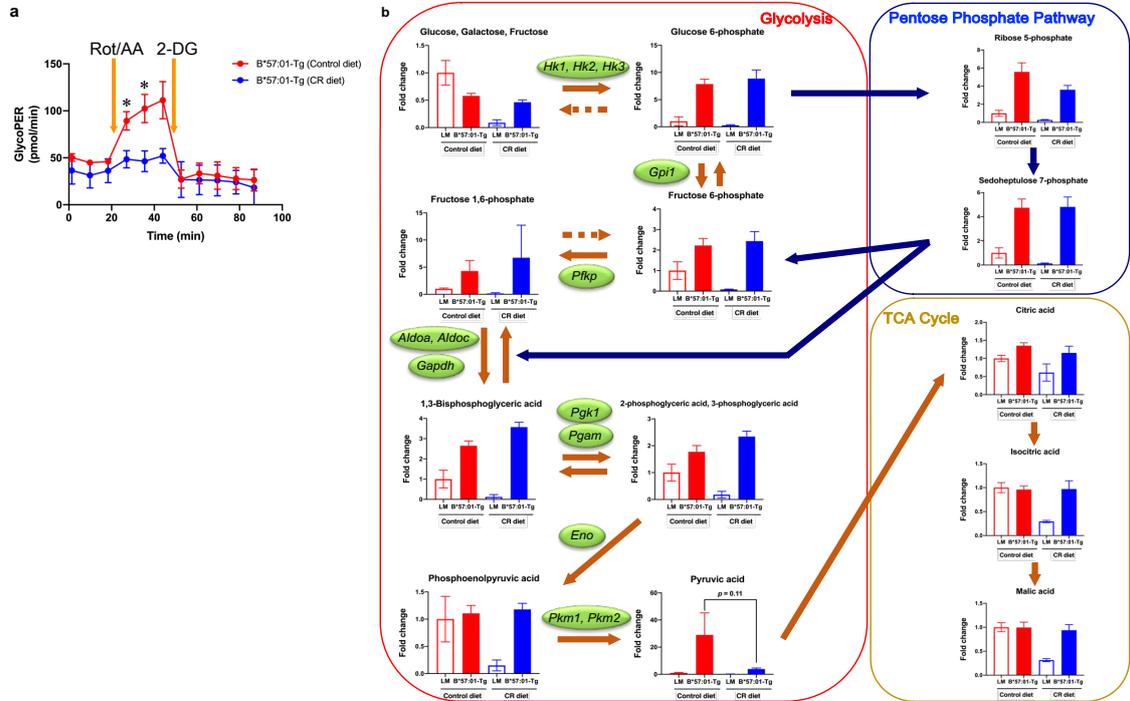


図5 | カロリー制限 (CR) B*57:01-Tg マウスにおけるCD8⁺T細胞の解糖系代謝の変化

次にCD8⁺T細胞機能・皮膚免疫毒性の変化を2-DG処置実験と同様に評価したところ、カロリー制限食給餌群ではリンパ節中のエフェクターCD8⁺T細胞の割合およびIFN- γ 産生CD8⁺T細胞の割合が通常食給餌群と比較して有意に抑制された(図6a, b)。さらに、カロリー制限食給餌群では血中TARC量の増加および皮膚組織中へのCD8⁺T細胞の浸潤のいずれも認められなかった(図6c, d)。カロリー制限状態によりCD8⁺T細胞における解糖系代謝が低下したABC投与B*57:01-Tgマウスにおいても薬疹発症が抑制されたことから、食事内容によって生体での栄養状態が異なる場合においても薬物過敏症の発症の強弱が変動することが示唆された。

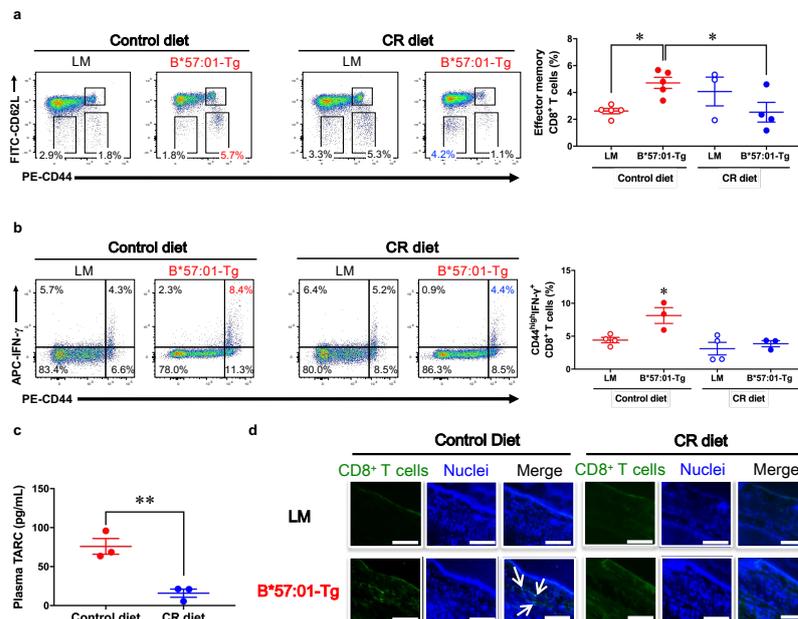


図6 | カロリー制限 (CR) B*57:01-Tg マウスにおける薬疹発症の評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kazaoka Akira, Fujimori Sota, Yamada Yushiro, Shirayanagi Tomohiro, Gao Yuying, Kuwahara Saki, Sakamoto Naoki, Susukida Takeshi, Aoki Shigeki, Ito Kousei	4. 巻 3
2. 論文標題 HLA-B*57:01-dependent intracellular stress in keratinocytes triggers dermal hypersensitivity reactions to abacavir	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pnasnexus/pgae140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Susukida Takeshi, Sasaki So-ichiro, Shirayanagi Tomohiro, Aoki Shigeki, Ito Kousei, Hayakawa Yoshihiro	4. 巻 165
2. 論文標題 Drug-induced altered self-presentation increases tumor immunogenicity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 115241 ~ 115241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2023.115241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Dung Nguyen Tien, Susukida Takeshi, Uche Sisca, He Ka, Sasaki So-ichiro, Hayashi Ryuji, Hayakawa Yoshihiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Calorie Restriction Impairs Anti-Tumor Immune Responses in an Immunogenic Preclinical Cancer Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 3638 ~ 3638
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu15163638	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Susukida Takeshi, Kuwahara Saki, Song Binbin, Kazaoka Akira, Aoki Shigeki, Ito Kousei	4. 巻 4
2. 論文標題 Regulation of the immune tolerance system determines the susceptibility to HLA-mediated abacavir-induced skin toxicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02657-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Song Binbin, Aoki Shigeki, Liu Cong, Susukida Takeshi, Kuwahara Saki, Ito Kousei	4. 巻 463
2. 論文標題 The PD1 inhibitory pathway and mature dendritic cells contribute to abacavir hypersensitivity in human leukocyte antigen transgenic PD1 knockout mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology	6. 最初と最後の頁 152971 ~ 152971
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tox.2021.152971	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10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 薄田健史, 孫雨農, 青木重樹, 伊藤晃成, 早川芳弘
2. 発表標題 薬物過敏症発症におけるCD8+ T細胞の解糖系代謝の重要性
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Takeshi Susukida, Shigeki Aoki, Yuchen Sun, Yoshihiro Hayakawa
2. 発表標題 Glycolysis in CD8+ T cells plays a major role in the onset of HLA-mediated idiosyncratic drug-induced autoimmune toxicity mouse model
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takeshi Susukida, Shigeki Aoki, Yoshihiro Hayakawa
2. 発表標題 Glycolysis in CD8+ T cells plays a major role in the onset of HLA-mediated idiosyncratic drug toxicity
3. 学会等名 2023 International Joint Meeting of the 23rd International Conference on Cytochrome P450 and the 38th Annual Meeting of the Japanese Society for the Study of Xenobiotic (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 薄田健史, 青木重樹, 孫雨晨, 早川芳弘
2. 発表標題 HLA多型の関与する薬物過敏症の発症における解糖系代謝の重要性
3. 学会等名 第30回日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 薄田健史, 青木重樹, 早川芳弘
2. 発表標題 カロリー制限がHLA多型の関与する薬物毒性発症に及ぼす影響
3. 学会等名 第50回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 薄田健史, 青木重樹, 早川芳弘
2. 発表標題 細胞内エネルギー代謝環境の変化がHLA多型の関与する薬物過敏症の発症に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 薄田健史, 青木重樹, 早川芳弘
2. 発表標題 細胞内代謝環境の変化がHLA多型の関与する薬物過敏症の発症に及ぼす影響
3. 学会等名 第29回日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeshi Susukida, Shigeki Aoki, Yoshihiro Hayakawa
2. 発表標題 Intracellular metabolism change affects the susceptibility to HLA-mediated idiosyncratic drug toxicity
3. 学会等名 日本薬物動態学会第37回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 風岡顯良, 薄田健史, 桑原佐季, 青木重樹, 伊藤晃成
2. 発表標題 キメラ型HLA導入マウスを用いた特異体質薬物毒性の評価
3. 学会等名 第28回 HAB研究機構学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木重樹, 桑原佐季, 薄田健史, 風岡顯良, 伊藤晃成
2. 発表標題 HLA-B*57:01 遺伝子導入マウスを用いた免疫抑制因子の排除によるアパカビル依存的特異体質毒性の再現
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第36回年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

免疫の抑制系が医薬品による副作用発症をコントロールすることを発見
https://www.chiba-u.ac.jp/others/topics/info/post_1011.html
 免疫の抑制系が医薬品による副作用発症をコントロールすることを発見
<https://www.u-toyama.ac.jp/news-education/35334/>

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
研究協力者	孫 雨晨 (Sun Yuchen) (60818904)	国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・主任研究官 (82601)	

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