

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790611

研究課題名（和文） アロプリノールによる重症薬疹のメカニズム解析

研究課題名（英文） Analysis of the mechanisms of allopurinol-induced severe cutaneous adverse reactions

## 研究代表者

杉山 永見子 (SUGIYAMA EMIKO)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・研究助手

研究者番号：40574695

研究成果の概要（和文）：アロプリノール及びフェニトインをモデル医薬品として、ヒト肝由来組織を用い、反応性代謝物と生体内タンパク質との共有結合体(アダクト)を生成するかどうかを検討した。フェニトインでは、チトクローム P450 活性及び細胞内グルタチオン濃度が、アダクト生成に重要であることが示された。また、アロプリノールの主な代謝経路にチトクローム P450 の関連を示す報告はされていないが、本研究では、生体内でアダクトを生成する際、チトクローム P450 が関わっている可能性が示され、ハプテン仮説の成立が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To investigate whether allopurinol or phenytoin generate drug-protein adduct, each drugs were incubated with various human liver tissues. As a result, it is suggested that cytochrome P450 activities and the concentration of glutathione in cells are of importance for generation of drug-protein adduct formation with phenytoin. In addition, although it have not been reported that P450 activities are involved in the allopurinol metabolism, the result of this study suggested that P450 activities played a role in generation of the drug-protein adduct.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：医薬品副作用・反応性代謝物・アロプリノール

## 1. 研究開始当初の背景

## 1) 重症薬疹について

重症薬疹とは、時に生命の危険を伴う重篤な薬疹であり、代表としてスティーブンス・ジョンソン症候群(SJS)や中毒性表皮壊死症(TEN)が挙げられる。薬剤による副作用として発症することが多いとされ、発症頻度は、それぞれ人口 100 万人当たり SJS では約 3～4

人、TEN では 1 人と低いものの、致死率は、5～30%と比較的高い。また、回復しても目や呼吸器に後遺症が残る場合が多く、重篤な副作用の中でも特に問題となっている。

## 2) HLA 遺伝子型と SJS/TEN 発症の関連

近年、SJS/TEN の発症とヒト白血球抗原(HLA)の特定遺伝子タイプが非常に強い相関

を示すことが明らかにされた。また、その相関には、民族特異性や薬剤特異性があることも明らかとなっている。

我々は、発症率が低い SJS/TEN 患者の検体を日本中の病院から集積できるシステムを構築し、日本人における SJS/TEN 発症症例の HLA タイプの解析を行っている。その成果の一つとして、アロプリノールは、日本人において *HLA-B\*58:01* が SJS/TEN 発症の遺伝子マーカーであることを報告している。

### 3) ハプテン仮説と p-i コンセプト

医薬品の多くは低分子量であるため、それ自体はアレルギー性を持たない。生体内に取り込まれた後、代謝活性化を受けて化学構造が変化し、反応性の高い中間体が生成することがある。この様な代謝物は、反応性代謝物とよばれ、生体内のタンパク質や核酸などの高分子を共有結合し、アレルギー、肝毒性、組織壊死、変異原性やがん原性の原因になると考えられている。このようなハプテン仮説は提唱されてはいるものの、証明した報告はない。一方、最近、共有結合を形成せずに、医薬品自体が HLA と弱く会合した状態で T 細胞受容体に直接認識されることがカルバマゼピンの知見を例に提唱されており、pharmacological interaction with immune receptors the (p-i) コンセプトと呼ばれている。しかし T 細胞の活性化には高い薬物濃度が必要で、否定的な知見も他の医薬品では報告されており、SJS/TEN 発現の初期過程メカニズムに関して結論は得られていない。

## 2. 研究の目的

重症薬疹の一種である SJS/TEN を含めた薬物アレルギー発症の初期段階(感作段階)のメカニズムについては、ハプテン仮説が有力ではあるものの、未だ一定の結論が得られて

いない。

本研究は重症薬疹を発現しやすいアロプリノール及びフェニトインをモデル医薬品として、医薬品が細胞内に取り込まれてからタンパク質に結合し、さらに薬物結合抗原ペプチドとして HLA 分子に結合した状態で提示される初期メカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究は、アロプリノール及びフェニトインを対象とした。<sup>14</sup>C 標識アロプリノールは合成依頼品であり、量が限られていたため、同じく重症薬疹を発現しやすいとされるフェニトインを対象とし、実験を開始した。

まず、各化合物が、代謝活性化を受けてタンパク質と共有結合するかどうかを明らかにするため、ヒト肝組織由来試料を用いて、反応性代謝物と生体内タンパク質との共有結合体(アダクト)生成の条件検討を行った。

<sup>14</sup>C 標識したフェニトイン及びアロプリノールは、日本アイソトープ協会から購入した。白人由来の肝細胞の S9 画分、サイトゾル画分、及びミクロソーム画分(各々150人分をプールした画分)、ヒト初代肝細胞(個人由来)、並びに NADPH regeneration system は、日本 BD Gentest 社より購入した。

### 1) アダクト形成の条件検討

①ミクロソーム画分、サイトゾル画分、S9 画分を用いたアッセイ系

0.1 mM フェニトイン (231 KBq) または 0.1 mM アロプリノール (227 KBq)、NADPH regeneration system を含むリン酸緩衝液 (pH 7.4) を 37°C で 5 分加温後、種々の条件で各肝組織画分を加え、攪拌後、37°C で 60 分間インキュベートした。氷冷後、100,000 x g で 60 分間 (4°C) 超遠心し、その上清と沈殿

から各々タンパク質を抽出した。

## ②ヒト初代肝細胞を用いたアッセイ系

グルタチオン合成阻害剤であるブチオニンスルホキシミン (BSO) を含む肝細胞用の ISOM' s 培地でヒト初代肝細胞を CO<sub>2</sub> インキュベータにて、37°C、1 時間処理した。BSO 処理後、0.1 mM フェニトイン (924KBq) または 0.1 mM アロプリノール (908KBq) を含む ISOM' s 培地で 37°C、2 時間反応させ、100 x g で 5 分間 (4°C) 遠心した沈殿 (細胞画分) からタンパク質を抽出した。

## ③ヒト初代肝細胞を破砕したホモジネートを用いたアッセイ系

ヒト初代肝細胞を BSO 入り ISOM' s 培地で CO<sub>2</sub> インキュベータにて 37°C、1 時間処理した後、リン酸バッファーで洗浄を行い、超音波で破砕し、ホモジネートを調製した。ホモジネートに 0.1 mM アロプリノール (45KBq) を加え、NADPH regeneration system や ATP を加えた各条件で恒温槽にて 37°C、1 時間反応させた。氷冷後、超遠心 (100,000 x g、4°C、1 時間) した上清及び沈殿からタンパク質を抽出した。

## 2) SDS-PAGE と放射性同位体の検出

抽出したタンパク質について、Bradford 法によりタンパク質量を測定した。スタンダードとして BSA を用いた。抽出タンパク質にサンプルバッファーを加え、100°C、5 分加熱処理し、SDS-PAGE を行った。ゲルは、1mm 厚のグラジエントゲル、または 2mm 厚の 10% もしくは 12.5%ゲルを使用した。電気泳動後のゲルを PVDF 膜に転写後、または、ゲルドライヤーで乾燥後、放射性同位体検出用プレートに露光し、GE ヘルスケア バイオサイエンス社製 Typhoon 9400、または富士フィルム製

イメージング機器 BAS-2500 により、画像の取り込みを行なった。

## 4. 研究成果

### 1) フェニトインを用いた実験結果

<sup>14</sup>C 標識フェニトインを用いた実験では、NADPH 添加条件下でミクロソーム画分のみと反応させた沈殿画分で分子量 30kDa~60kDa の位置に、2 本のバンドが検出された。このバンドは、<sup>14</sup>C-フェニトインが結合したと推定されるアダクトタンパク質と考えられる。NADPH を添加していないサンプルでは、50 日露光後もバンドが見られなかった。フェニトインの主代謝経路は CYP2C9 による水酸化であることや、反応性代謝物の生成には、さらに CYP2C19 や CYP3A4 が関わるということが知られている。本研究においても、フェニトイン結合タンパク質の生成には、チトクローム P450 の関与が示唆された。

一方、S9 画分を用いて反応させた抽出タンパクでは、明確なバンドは確認できなかった。S9 にはグルタチオン等の反応性代謝物除去関連因子が含まれており、この影響によるものと考えられる。

また、BSO 処理及び未処理のヒト初代肝細胞と反応させて得られた抽出タンパクで、薄いながらもバンドが検出された。BSO 処理を行ったヒト初代肝細胞抽出タンパクの方が若干ではあるが、濃いバンドが得られており、細胞内グルタチオン濃度を低下することでアダクトタンパク生成量が増加したものと推察される。

以上の結果より、フェニトインのアダクトタンパクの生成には、チトクローム P450 及び細胞内グルタチオン濃度の重要性が示唆された。

### 2) アロプリノールを用いた実験結果

フェニトインを用いた実験を踏まえて、<sup>14</sup>C 標識アロプリノールを用いて、NADPH 添加条件下でマイクロソーム及びサイトゾル画分を主として用いたアッセイ系、ヒト初代肝細胞を用いたアッセイ系を実施したが、どちらも明確なバンドは得られなかった。

ヒト初代肝細胞とフェニトインを用いた反応を行った実験結果では、低分子量(15kDa 以下)の位置に未反応と考えられるシグナルが多く検出されたが、アロプリノールで同様の実験を行った結果では、この位置のシグナルは、非常に少なかった。このことから、細胞内にアロプリノールが取り込まれていない可能性が考えられたため、ヒト初代肝細胞を破砕して得られたホモジネートを用いて反応を行った。

NADPH 添加条件下でホモジネートと反応させた沈殿画分から抽出したタンパク質で、75kDa 付近にブロードではあるが、バンドが検出された。このバンドは <sup>14</sup>C 標識アロプリノールが結合したと推定されるアダクトタンパク質と考えられる。アロプリノールは、キサンチンオキシダーゼにより酸化され、大部分がオキシプリノールとなる。主代謝物であるオキシプリノールもキサンチンオキシダーゼ抑制作用を有する活性体である。アロプリノールの主な代謝経路には、P450 の関連を示すものは報告されていないが、本研究の結果は、アロプリノールが生体内でアダクトを生成する際、P450 が関わっていることを示唆するものである。また、ハプテン仮説の成立の可能性も見出した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

①杉山永見子、鹿庭なほ子、高橋幸利、古谷

博和、村松正明、木下茂、蒔田泰誠、黒瀬光一、頭金正博、前川京子、矢上晶子、安部正通、外園千恵、上田真由美、池田浩子、池澤善郎、日本データサイエンスコンソーシアム、松永佳世子、相原道子、斎藤嘉朗：日本人における抗てんかん薬誘因性 SJS/TEN と HLA タイプとの相関解析. 日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 28-30 日 (横浜)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉山 永見子 (EMIKO SUGIYAMA)

国立医薬品食品衛生研究所・

医薬安全科学部・研究助手

研究者番号：23790611