

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670068

研究課題名(和文)薬物性肝障害発症・増悪メカニズムに基づいた改良型リンパ球幼弱試験法の開発

研究課題名(英文)Construction of improved lymphocyte transformation test based on the onset and aggravation mechanism of drug-induced liver injury

研究代表者

伊藤 晃成 (Ito, Kousei)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30323405

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)：薬剤性肝障害(DILI)は一部で過敏反応の関与が指摘されているが、DILI被疑薬検査とされるリンパ球幼弱試験(LTT)では一部薬で疑陰性となる可能性がある。この弱点を克服するには薬物代謝活性と抗原提示能を兼ね備える肝細胞を系に添加することが必要である。そこで、全身に同じくDILIと関連するヒトHLAを発現する遺伝子組換えマウスを作出した。並行して、マウスから調製した初代培養肝細胞に一過性にDILIと関連するヒトHLAを任意に高発現させることが可能なアデノウィルス構築した。従来のLTTにこれらヒトHLAを発現する肝細胞を組み合わせることで、より検出力に優れた検査が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Drug hypersensitivity reaction is one of the categories of drug-induced liver injury (DILI). However, current clinical test such as lymphocyte transformation test (LTT) could not detect all the causative drugs with hypersensitivity reaction because the assay does not include hepatocytes that metabolize drugs and subsequently propose antigens to the lymphocytes. To overcome that shortcoming, it is needed to add hepatocytes that are endowed with metabolic enzyme activity and antigen presentation. We firstly constructed transgenic mice constitutively expressing human HLA molecule related to some kinds of DILI. In addition, adenoviruses carrying HLA to transiently express its product in mouse primary hepatocytes were constructed. It is expected that the sensitivity of current LTT assay is improved by using these novel hepatocytes tools.

研究分野：毒性学

キーワード：HLA 薬剤性肝障害 リンパ球幼弱試験

1. 研究開始当初の背景

薬剤性肝障害 (DILI) は一部で過敏反応の関与が指摘されている。この反応には特定の抗原に反応して増殖した細胞障害性 T 細胞やヘルパー T 細胞などの T 細胞クローンが深く関与すると考えられている。すなわち、薬物曝露により傷害された、あるいは死んだ肝細胞が樹状細胞などに貪食、消化され、生じた薬物修飾ペプチド断片がヒトリンパ球抗原 (HLA) 上に提示されると、これに結合する受容体を持つ特定の T 細胞クローンが増殖する。そしてこれら T 細胞クローンが、同様の薬物由来抗原を提示する肝細胞を攻撃する結果、DILI が発症すると考えられている。薬物過敏症の臨床検査法の一つであるリンパ球幼弱化試験 (LTT) では、末梢より調製したリンパ球に直接被疑薬を添加し、反応する T 細胞クローンの増殖の有無で判定が行われる。DILI では肝細胞が薬物修飾ペプチドを特定の HLA 型で提示するステップが重要と考えられるが、上記 LTT では肝細胞が系に含まれないため、結果が疑陰性になる可能性がある。このような現行の LTT 法の弱点を克服するには薬物代謝活性と抗原提示能を兼ね備える肝細胞を含んだ LTT アッセイ系の構築が必要である。

2. 研究の目的

薬物代謝活性と抗原提示能を兼ね備えた肝細胞をリンパ球と共培養し、薬物特異的なリンパ球の増殖判定が可能となる系の構築を最終目的とし、それに必要なツールを個々に開発する。

3. 研究の方法

HLA キメラトランスジェニック (Tg) マウスの作製：全身に HLA を恒常的に発現するように、CAG をプロモータとするベクターにヒト HLA 遺伝子を導入した。このとき、HLA の 3 ドメインをマウスと入れ替え、かつヒ

コルナウイルス由来の 2A ペプチド配列を挟んでヒト 2 μ グロブリン遺伝子を下流に連結させたコンストラクトを一つのベクターとして作製した。このベクターを制限酵素切断して直鎖状にしたものを C57BL6 系統マウス受精卵に注入し、Tg マウスを作製した。

HLA アデノウイルスの作製：初代培養肝細胞に一過性に遺伝子導入可能なヒト HLA-B*5701 キメラ型アデノウイルスの作製を行った。免疫沈降によって HLA を効率的に回収できるよう C 末端に Flag タグを付与した。陰性対照として HLA-B*5701 と数塩基しか変わらない HLA-B*5703 遺伝子を有するコンストラクトも併せて構築した。

4. 研究成果

本研究では、薬物修飾ペプチドが肝細胞に発現する特定の HLA によって提示され、これを介して最終的に T 細胞が活性化されるような LTT 系を作製することである。この系の成否は、薬物提示能を有する肝細胞の調達に依存すると考えられる。そこで本研究では、このような肝細胞を得るために 2 つの方法をとった。1 つめはヒト HLA を生来有するトランスジェニックマウスから初代培養肝細胞を得る方法、2 つめは初代培養肝細胞に HLA を一過性に導入して用いる方法、である。初代培養肝細胞は薬物代謝能が比較的維持されることが知られている。また、HLA 多型としては、臨床において DILI ではこれまで報告されている中で最も高いオッズ比を有する HLA-B*5701 を選択した (抗生物質フルクロキサシリンによる DILI においてオッズ比 80 倍)。

1 つめの方法では、少なくとも肝臓に十分な量発現し、かつ最終的に薬物を提示した後に T 細胞受容体に結合して T 細胞に活性化シグナルを送ることができる HLA を発現させる必要がある。そこで、全身に発現が期待される強力なプロモータ活性を有する CAG を用い、

かつ HLA の安定発現には会合蛋白質である 2 μ グロブリンも必要であることから、これのヒト型を同じベクターにタンデムでつなぎ確実に一細胞内に共発現する設計とした。さらに、HLA がマウスリンパ球上の T 細胞受容体を、種を跨いで活性化できることを期待して、HLA の 3 ドメインをマウス型とするキメラ型 HLA として設計した。このようにいくつか工夫を施したベクターコンストラクトは過去に発現や機能が十分に調べられた例がないため、*in vitro* において目的の HLA 蛋白質が機能的に発現するかを HeLa 細胞でのプラスミド一過性発現で確認した。その結果、遺伝子導入細胞ではウェスタンブロットで正しい位置に HLA ならびに 2 μ グロブリン蛋白質が検出され、フローサイトメータ、免疫染色等から HLA 蛋白質の少なくとも一部は細胞表面に発現することも確認された。さらに、過去に HLA-B*5701 によって特異的に提示されることが知られている陽性対照薬物(アバカビル)を曝露し、Flag タグで免疫沈降した後に、ここに含まれるアバカビル量を定量したところ、既報通り、B*5701 ではアバカビルが免疫沈降物に含まれること、そして B*5701 と数塩基のみ異なる B*5703 を同様のコンストラクトで発現させた場合には、提示量が著しく低かったことから、今回構築したキメラ型 HLA は薬物特異的な提示能を保持していることが示された。そこで、このベクターを用いて Tg マウスの構築を行った。得られた Tg マウスはメンデル則に従って誕生し、一見して野生型と比べ目立った表現形の違いは認められなかった。一方で各臓器における HLA 発現量を調べたところ特に肝臓においては mRNA レベルで発現が見られたものの、蛋白質レベルでは他の臓器(皮膚や肺など)に比べ発現が低く、キメラ型 HLA 蛋白質のマウス細胞内での安定性がヒト細胞内と異なる、あるいは臓器間で安定性が異なるなどの原因が考えられた。今後は当該 Tg マウ

スより肝細胞と末梢血リンパ球を単離して共培養する系への利用を考えているが、HLA 蛋白質発現量について単離後に誘導を行うなど何らかの改善の余地があると考えられた。原理的にはこれら Tg マウスより肝細胞と末梢血リンパ球を回収して共培養する系がうまく機能することを示すことでコンセプトの正しさが実証できると期待される。

並行して、抗生物質 Flucloxacillin の DILI に関連する HLA 多型 HLA-B*5701(キメラ型)をアデノウィルスを用いてマウス初代培養肝細胞に一過性に発現させ、その後のリンパ球との共培養実験に利用可能な細胞の構築も試みた。アデノウィルスの MOI を検討した結果、MOI20 の感染で 48 時間後に抗 Flag 抗体を用いたウェスタンブロットで十分検出されるだけの HLA 蛋白質の発現を得ることができた。さらに抗 FLAG を用いた免疫沈降においても十分量の HLA を回収することができた。ここで構築したアデノウィルスベクターを用いた肝細胞への HLA キメラ型 HLA 一過性発現法はヒト初代培養肝細胞への任意の HLA 型の発現にも利用できることから、将来的にはこれをリンパ球と共培養し、そこに薬物を曝露して判定を行う改良型 LTT 試験への応用が可能と考えている。

以上、本研究では最終的に改良型 LTT の構築までには至らなかったものの、これを実現するために必要な個々のツールを作製することができたという点で、一定の成果を得ることができたと考える。

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 5 件)

1) 向後晃太郎, 青木重樹, 聡劉, 関根秀一

& 伊藤晃成 (2015年3月25日~28日). ヒトにおける特異体質毒性評価を目的としたキメラ. 型 HLA 遺伝子導入マウスの作出. 日本薬学会第135年会. 神戸

2) 伊藤晃成 (2015年1月30日). 特異体質毒性リスク予測精度改善に向けた多面的アプローチ. 薬物動態談話会1月例会. 東京

3) 向後晃太郎, 青木重樹, 関根秀一 & 伊藤晃成 (2014年10月4日). 特異体質毒性評価に利用可能なヒトマウスキメラ型 HLA 遺伝子の構築. 第58回日本薬学会関東支部大会. 東京

4) 伊藤晃成 (2014年9月25日). 薬剤性肝障害のスクリーニング系構築・メカニズム解明に向けた取組. In 第4回 杉山特別研究室(理研)公開シンポジウム. 東京

5) 伊藤晃成 (2013年5月26日). 薬剤性肝障害発症予測に向けた臨床・基礎からのアプローチ. In 第30回日本TDM学会・学術大会. 熊本

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 晃成 (Ito Kousei)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号: 30323405

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: