

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670074

研究課題名(和文) 特異体質性薬物副作用リスク評価手法の構築

研究課題名(英文) Establishment of the method evaluating the risk for idiosyncratic adverse drug reactions.

研究代表者

鈴木 洋史 (Suzuki, Hiroshi)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80206523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：特異体質性副作用の発現には患者の遺伝背景の関与が想定され、アバカビル過敏症ではHLA-B*57:01とアバカビルの相互作用が免疫原性を示すことが報告されている。特異体質性副作用の発現が知られる7種類のHLA-B遺伝子型と薬物の組合せで同様の検証を行った結果、B*35:05とネビラピンのみでアバカビル同様の強固な相互作用が認められた。陰性対象との配列比較から抗原提示溝内へのネビラピンの結合が想定され、実際にネビラピン存在下で提示される抗原ペプチドの傾向が変化し、変性HLA蛋白質の巻戻し実験からも支持された。一方で、B*15:02とカルバマゼピンを含む他の組合せでは更なる解析が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：It has been indicated that genetic backgrounds of patients largely affect the risk for idiosyncratic adverse drug reactions. The interaction between HLA-B*57:01 and abacavir was well characterized and it might trigger immune reactions. We examined whether similar "HLA-drug" interactions are observed in the case of seven combinations of HLA-B genotypes and drugs. As a result, only one combination, B*35:05 and nevirapine, showed the strong interaction as observed in B*57:01 and abacavir. It was assumed that nevirapine associates to the antigen presenting pocket of HLA molecule due to the differences in primary sequence of B*35:05 and its negative control. Indeed, the tendency of peptide repertoire presented by B*35:05 changed in the presence of nevirapine. Refolding experiments using denatured HLA protein also supported this interaction. On the other hand, it would be need to consider different mechanisms of the interaction in other combinations including B*15:02 and carbamazepine.

研究分野：医療薬学

キーワード：薬剤反応性 免疫学 生体分子 トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

薬物による副作用は2種類に大別され、投与量増大に伴って原則全ての患者に発現しうる中毒性の副作用に対し、特定の患者にのみ臨床用量から発現する特異体質性の副作用が存在する。特異体質性副作用の発現には患者個人の遺伝背景の関与が想定され、適切な評価モデルも存在しないため、創薬開発段階におけるリスク評価は困難である。特異体質性副作用はスティーブンス・ジョンソン症候群/中毒性表皮壊死症を含む重症皮膚障害や薬物性肝障害、また全身性の過敏症など重篤なケースも多く含まれ、時に患者の生命が脅かされる临床上重要な課題である。

本研究開始前の段階で、患者の遺伝背景に着目した臨床研究が世界的に数多く進められており、特異体質性副作用の発現とヒト主要組織適合抗原複合体 (HLA) の特定の遺伝子型との間に相関が見出される例が多数報告されてきた。HLA は主に6つの遺伝子座で構成され、それぞれに500~3,000種もの遺伝子多型の存在が知られている。HLA分子は、細胞内外のタンパク質が分解されて生じた抗原ペプチドを、T細胞に提示する役割を担う免疫系の中心分子である。

特異体質性副作用発現と HLA 遺伝子型に関する臨床研究の中でも、アバカビルによる重篤な全身性の過敏症発現が強い相関性 (オッズ比 117) を示す HLA-B*57:01 に関しては (Mallal S et al, Lancet, 2002)、前向き臨床研究も行われ、HLA-B*57:01 の保有を予めスクリーニングし、非保有患者にのみアバカビル投与を行うことで過敏症発現を回避できることも示されており、アバカビル過敏症発現と HLA-B*57:01 の強い関連性が示されている (Mallal S et al, N Eng J Med, 2008)。そのため HLA-B*57:01 とアバカビルの組み合わせが、どのような分子機構で重症過敏症の発現に至るか、に関しても研究が進められ、HLA-B*57:01 タンパク質が抗原ペプチドを細胞表面へと提示する過程において、アバカビル分子が HLA-B*57:01 分子と相互作用し、免疫原性を示すことが報告された (Ostrov DA et al, PNAS 2012)。

これらの背景を踏まえ、本研究の開始時点では立証例の少なかった「特異体質性副作用の発症に HLA タンパク質と薬物分子の相互作用が関係する」という仮説は、一般的に成立しうるかを検証し、さらに薬物分子と HLA タンパク質の主な相互作用様式はアバカビルのケースで見出された様式と同様であるのか、を明らかにする必要があると考えた。さらに、創薬段階において候補化合物の特異体質性副作用発症リスクを評価するためには、多様な遺伝子型の HLA タンパク質に対して候補化合物が相互作用するか否か、を包括的に評価することが有用であり、インシリコのシミュレーション手法を最終的に構築していく必要がある。そのためにも、HLA

タンパク質上の薬物分子結合部位の同定は重要であると考えられた。

2. 研究の目的

特異体質性副作用発現との関連性が報告されている他の HLA タンパク質 薬物分子の組合せにおいても、アバカビルと同様の相互作用様式であるならば、医薬品候補化合物と HLA タンパク質の相互作用を評価することで、これまで困難であった特異体質性副作用の誘発リスクを予測することが可能になると考えられる。HLA 遺伝子型が極めて多数に上ることを考慮すると、全ての遺伝子型を網羅して HLA タンパク質と薬物分子の相互作用をウェット実験によって検証することは困難である。将来的には、各 HLA タンパク質の立体構造情報に、化合物が結合するサイトの情報を加えてインシリコのドッキングシミュレーションを行い、相互作用の可能性が高い組合せをウェット実験によって検証する、という一連のシステムとして実用化されることが現実的である。従って、他の特異体質性副作用に関しても、アバカビルのケースと同様の相互作用様式であるか検証することが必須である。

そこで、本研究では過去の臨床研究から見出された HLA 遺伝子型と特異体質性副作用発現が相関する複数のケースに関して、アバカビル型の相互作用様式で説明可能か否かを検証することを主な目的とした。

3. 研究の方法

アバカビル型の HLA タンパク質 薬物分子間相互作用を検出するための実験系構築と、それをを用いた評価

アバカビル型の相互作用様式の場合、抗原提示溝内部に結合した薬物分子の外側に抗原ペプチドが結合する構造であるため、一旦結合した薬物分子は、HLA 分子が変性しない限り解離しないと想定された。そこで本検討では、薬物を添加した培地中で産生させた分泌型 HLA 分子から、透析およびアフィニティクロマトグラフィを用いた2段階精製操作によって、非結合型薬物分子を十分に除去し、ビーズ上へ固相化された HLA 分子を有機溶媒で変性させることで、結合する薬物分子を抽出し、LC-MS/MS による定量を行った。

さらに、特異体質性副作用発現との相関性が報告されている HLA-B 遺伝子型と種々の薬物分子の組合せに関して、確立した実験手法を用いて、アバカビル型の相互作用を示すか否かを検証した。検証対象とする組み合わせとしては、アロプリノールと HLA-B*58:01、カルバマゼピンと HLA-B*15:02、ラモトリギンと HLA-B*38:01、メタゾラミドと HLA-B*59:01、ネビラピンと HLA-B*35:05、フェニトインと HLA-B*15:02、スルファメ

トキサゾールと HLA-B*38:02、以上 7 種類の組み合わせを選択した。さらに陰性対照と想定される近縁の HLA 型なども含めて HLA タンパク質発現系を準備し、全ての組み合わせに関してアバカビル型の相互作用が検出できるか否かを検証した。

アバカビル型の相互作用様式を示す可能性が新規に見出された HLA-B*35:05 タンパク質とネビラピン分子の組み合わせに関して、分子間相互作用が抗原提示に与える影響の評価

の検討から、アバカビル型の相互作用様式を示す可能性が新たに見出された HLA-B*35:05 とネビラピンの組み合わせに関して、アバカビルのケースで過去に報告されているような、HLA タンパク質に提示される抗原ペプチドレパートリーの変化をもたらすか否かを検証することとした。

HLA-B*35:05 に提示されているペプチドと類似の手法で回収し、高分解能質量分析装置を用いてペプチド配列の同定を行った。一般に Class I HLA タンパク質によって抗原提示されるペプチドは、アミノ酸残基 9 ~ 11 残基の長さのものが中心的であり、また N 末端から 2 番目の位置の残基 (P2 位) および C 末端の位置の残基 (P 位) のアミノ酸に対する選択性が高い事が知られている。そこでこれらの位置を中心に、アミノ酸選択性に関して評価を加えた。

さらに、上述の検討からネビラピン曝露下のみで検出されたペプチド配列、およびネビラピン曝露の有無に依らず全てのサンプルで検出されたペプチド配列をそれぞれ選択して合成ペプチドを調製した。グアニジン変性条件下で調製した変性 HLA-B*35:05 タンパク質に対し、グアニジン除去処理後、上記の合成ペプチドおよび鎖組み換えタンパク質を添加し、HLA タンパク質鎖のリフォールディング効率を評価した。本検討によって、選択したペプチド断片の、HLA-B*35:05 タンパク質に対する結合親和性を評価した。さらに、ネビラピンへの曝露が結合親和性に与える影響についても評価を加えた。

アバカビル型の相互作用が認められなかった組み合わせに関する、HLA タンパク質と薬物分子間の相互作用様式の探索

の検討から、特異体質性副作用との関連性が報告されている HLA タンパク質と薬物分子の組み合わせ 7 種類のうち、ネビラピンと HLA-B*35:05 の組み合わせを除いた、残り 6 種類に関しては、アバカビル型と異なった相互作用様式の存在が想定された。そこで、重症皮膚障害の発症と強い相関性を示すことが報告されており、分子機序に関する研究報告も複数ある、HLA-B*15:02 とカルバマゼ

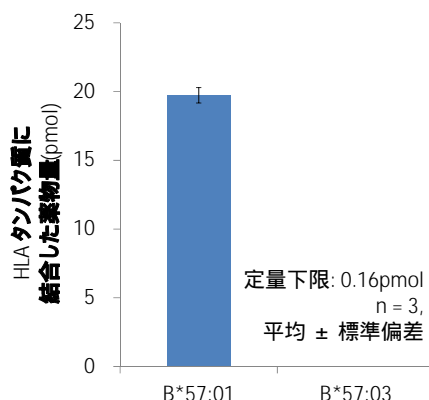
ピンの組合せに着目した。

カルバマゼピンと HLA-B*15:02 の相互作用様式に関しては、現在まで複数の説が提示されている。具体的には抗原提示溝外部において相互作用するという報告 (Wei C-YY et al, J Allergy Clin Immunol, 2012) と、抗原提示溝内部において F ポケットとは異なる部位に相互作用するという報告 (Illing PT et al, Nature, 2012) が存在する。そこで申請者は、各報告と同じ条件を用いて再現性の検証を試みた。

4. 研究成果

アバカビル型の HLA タンパク質 薬物分子間相互作用を検出するための実験系構築と、それをを用いた評価

薬物を添加した培地中で産生させた分泌型 HLA 分子から、透析およびアフィニティクロマトグラフィを用いた 2 段階精製操作によって、非結合型薬物分子を十分に除去し、ビーズ上へ固相化された HLA 分子を有機溶媒で変性させることで、結合する薬物分子を抽出し、LC-MS/MS による定量を行う手法により、HLA-B*57:01 とアバカビルの相互作用は感度良く検出できることが確認された。



次いで、他の HLA タンパク質と薬物の組み合わせに関して、上記の手法を用いて評価したところ、HLA-B*35:05 とネビラピンの組合せにおいてのみ、相互作用が検出された。アバカビルのケースと類似の、抗原結合溝内部へ薬物分子が結合するような、強固な相互作用様式が想定された。一方、その他 6 種の組合せに関しては相互作用が検出されず、これらの組合せはアバカビル型の相互作用ではない可能性が示唆された。

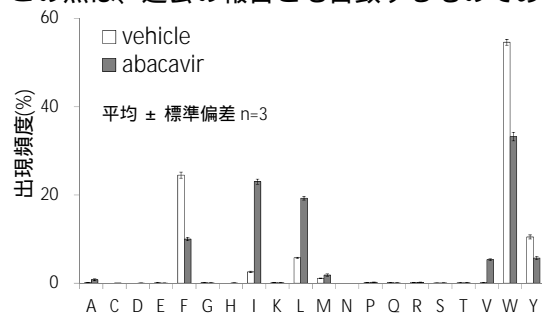
アバカビル型の相互作用様式を示す可能性が新規に見出された HLA-B*35:05 タンパク質とネビラピン分子の組み合わせに関して、分子間相互作用が抗原提示に与える影響の評価

まず、アミノ酸一次配列が類似しており、ネビラピンと相互作用が認められなかった HLA-B*35:01 と B*35:05 を比較したところ、

両者で差があるアミノ酸残基はFポケット周辺に集中していることが明らかとなった。この点は、ネビラピン分子がHLA-B*35:05のFポケットに相互作用している可能性を示唆している。この点は、抗原結合溝内部へ薬物分子が結合する可能性を示唆するの結果を支持すると考えられた。

さらに、HLAタンパク質に提示されている抗原ペプチドの配列を、高分解能質量分析装置を用いて決定する実験系を構築した。まず、アバカビルのケースに関してHLA-B*57:01に提示される抗原ペプチドが、アバカビルへの曝露に伴って、どのように変化するかを解析した。抗原提示溝内部のFポケットと相互作用するアミノ酸残基は、抗原ペプチドのC末端側PQ位のアミノ酸であり、この位置における各アミノ酸の出現頻度を比較したところ、通常の条件では高頻度を選択されるW、Fといった大きな脂溶性の側鎖を持つアミノ酸の出現頻度が、アバカビル曝露条件下では低下し、代わりにI、L、Vのような比較的小さい脂溶性側鎖を有するアミノ酸の出現頻度が增大することが明らかとなった。

この点は、過去の報告とも合致するものであ



り、本実験系は薬物曝露が抗原ペプチドに対して与える影響を、十分な感度で検出できるものと考えられた。そこで、新たに見出されたネビラピンのケースに関して、HLA-B*35:05タンパク質によって提示される抗原ペプチドの分析を行ったところ、ネビラピン曝露に伴い、HLA-B*35:05に提示されるペプチドレパートリーが変化しており、PQ位のアミノ酸選択性が、高頻度を選択されるFから、A、V、Iなど比較的小さい側鎖を有するアミノ酸残基へと、有意に変化していることが示された。

さらに、変性HLAタンパク質の巻き戻し実験系を用いて、ペプチドの結合特性についても検討を加えた。その結果、全ての検体で検出された抗原ペプチドから選択したペプチド配列(LPAKILVEF)では、ネビラピン曝露に伴う巻き戻り率の変化は認められなかったが、ネビラピン曝露条件下のみで検出された抗原ペプチドから選択したペプチド配列(SAYDGKDYLIA)に関しては、ネビラピン曝露に伴って巻き戻り率が大幅に増大することが確認され、ネビラピン分子がHLA-B*35:05タンパク質と相互作用することで、特定のペプチド配列の結合親和性を増大させていることが確認された。一連の結果

から、ネビラピンはHLA-B*35:05のFポケット周辺に結合し、提示される抗原ペプチドのレパートリーを変化させることで、免疫原性を生んでいると考えられた。この結果は、一部の特異体質性副作用に関して、アバカビル同様の相互作用が生じていることを示しており、創薬段階におけるリスク予測を実現する上で重要な基盤情報といえる。

アバカビル型の相互作用が認められなかった組み合わせに関する、HLAタンパク質と薬物分子間の相互作用様式の探索

カルバマゼピンとHLA-B*15:02の相互作用様式に関して、現在までに提唱されている2種類の説に関して、再現性の検証を行ったが、いずれの報告に関しても再現性は得られなかった。さらに、HLA分子を産生するホスト細胞を、細胞内ペプチドレパートリーが異なる別の細胞に変更するなど、様々な条件検討も加えたが、同様に再現性は得られなかった。今後は、HLA-B*15:02とカルバマゼピンの組合せに関して、HLAタンパク質と薬物分子が直接的に相互作用するのではなく、T細胞の活性化を引き起こしている可能性も考慮して、包括的に検証を進める必要があると考えている。

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)

[学会発表](計3件)

本間雅 薬物副作用に関するトランスレーショナル研究サイクル 日本薬物動態学会第30年会、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)、2015年11月12~14日

本間雅、長屋仁織、苅谷嘉顕、池淵祐樹、鈴木洋史 特異体質性薬物副作用の解析 東京大学医学部附属病院先端医療シーズ開発フォーラム2016、伊藤国際学術研究センター(東京都・文京区)、2016年2月

長屋仁織、本間雅、苅谷嘉顕、加藤智起、池淵祐樹、鈴木洋史 特異体質性副作用発現に関するHLAタンパク質-薬物分子の相互作用の解析 日本薬学会第136年会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)、2016年3月26~29日

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 洋史 (SUZUKI, Hiroshi)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 80206523

(2)研究分担者

本間 雅 (HONMA, Masashi)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号: 60401072