



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬科学）
報告番号	乙第1898号
学位記番号	論 第200号
氏名	平沢 真
授与年月日	平成 31年 3月 25日
学位論文の題名	特異体質性肝障害発症薬物とヒト白血球抗原との相互作用に関する研究
論文審査担当者	主査： 佐藤 匡史 副査： 頭金 正博, 平嶋 尚英, 肥田 重明

名古屋市立大学学位論文

特異体質性肝障害発症薬物と
ヒト白血球抗原との相互作用に関する研究

平成 30 年度(2019 年 3 月)

所属：第一三共株式会社

氏名：平沢 真

① 本論文は、2019年3月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 佐藤 匡史 准教授

副査 平嶋 尚英 教授

肥田 重明 教授

頭金 正博 教授

② 本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

1. M. Hirasawa, K. Hagihara, K. Abe, O. Ando and N. Hirayama
Interaction of Nevirapine with the Peptide Binding Groove of HLA-DRB1*01:01 and Its Effect on the Conformation of HLA-Peptide Complex.
Int. J. Mol. Sci., **19(6)**, E1660 (2018).
2. M. Hirasawa, K. Hagihara, K. Abe, O. Ando and N. Hirayama
In Silico and In Vitro Analysis of Interaction between Ximelagatran and Human Leukocyte Antigen (HLA) -DRB1*07:01.
Int. J. Mol. Sci., **18(4)**, E694 (2017).
3. M. Hirasawa, K. Hagihara, N. Okudaira and T. Izumi
The Possible Mechanism of Idiosyncratic Lapatinib-Induced Liver Injury in Patients Carrying Human Leukocyte Antigen-DRB1*07:01.
PLoS One, **10(6)**, e0130928 (2015).

③ 本論文の基礎となる研究は、第一三共株式会社において安東治博士の指導の下に行われた。

目次

略語	3
序論	4
実験方法	10
1) ドッキングシミュレーション	10
2) 分子動力学シミュレーション	11
3) <i>In vitro</i> ペプチド結合試験.....	13
第1章 ネビラピンと HLA-DRB1*01:01 の相互作用.....	16
1-1. 小序.....	16
1-2. 結果.....	17
1-2-1. ドッキングシミュレーション	17
1-2-2. 分子動力学シミュレーション	17
1-2-3. <i>In vitro</i> ペプチド結合試験.....	28
1-3. 考察.....	30
1-4. 小括.....	33
第2章 キシメラガトランと HLA-DRB1*07:01 の相互作用.....	34
2-1. 小序.....	34
2-2. 結果.....	35
2-2-1. ドッキングシミュレーション	35
2-2-2. 分子動力学シミュレーション	36
2-2-3. <i>In vitro</i> ペプチド結合試験.....	39
2-3. 考察.....	41
2-4. 小括.....	43
第3章 ラパチニブと HLA-DRB1*07:01 の相互作用.....	44
3-1. 小序.....	44
3-2. 結果.....	46
3-2-1. 分子動力学シミュレーション.....	46
3-2-2. <i>In vitro</i> ペプチド結合試験.....	54
3-3. 考察.....	55
3-4. 小括.....	57
第4章 新規 IDT リスク評価系としての可能性.....	58
4-1. 小序.....	58
4-2. 考察.....	59
4-2-1. ドッキングシミュレーション	59
4-2-2. 分子動力学シミュレーション	60
4-2-3. <i>In vitro</i> ペプチド結合試験.....	61
4-3. 小括.....	63
総括	64

参考文献.....65
謝辭.....73

略語

ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
BSEP	Bile salt export pump
CPB	クエン酸リン酸緩衝液
DILI	薬物性肝障害
DMSO	ジメチルスルホキシド
HA	ヘマグルチニン
HLA	ヒト白血球抗原
HSS	過敏症症候群
IDILI	特異体質性薬物性肝障害
IDT	特異体質性薬物毒性
LC-MS/MS	液体クロマトグラフィータンデム質量分析計
MBP	ミエリン塩基性タンパク質
MD	分子動力学
MHC	主要組織適合遺伝子複合体
MLE	MHC loading enhancer
ns	ナノ秒
p-i	Pharmacological interaction with immune receptors
RMSD	根平均二乗変位
RMSF	根平均二乗揺らぎ
SD	標準偏差
SJS	スティーブンス・ジョンソン症候群
TCR	T細胞受容体
TEN	中毒性表皮壊死症
TT	破傷風菌由来毒素

序論

薬物性肝障害 (DILI) は 1100 種類以上の薬物に認められる副作用であり¹⁾、医薬品の市場撤退および臨床開発中止の主要因の一つとなっている²⁾。発症頻度は数万人に 1 人程度と低く、多くの場合は軽度に留まり予後良好であるものの、劇症化患者では 60%以上が死亡もしくは肝移植を必要とするなど予後不良となり得る³⁾。特に欧米では DILI は急性肝不全 (劇症肝炎) 発症の主要因であり、米国では年間 300-500 人、フランスでは年間 500 人が DILI に起因する急性肝不全により死亡に至っている⁴⁾。DILI は発症機序に基づき”中毒性”と”特異体質性”に大別されるが、アセトアミノフェンに代表される様な、明確な用量依存性があり動物実験から予測可能な”中毒性”DILI はむしろ例外的で、大部分の DILI が”特異体質性”に分類されると考えられている⁵⁾。

特異体質性薬物毒性 (IDT) は、発症頻度や重篤度に用量および投与期間依存性が無く、薬物自身の性質のみならず、遺伝的および環境的因子、疾患等の患者側因子が複雑に関連して発症する極めて稀な薬物毒性である。通常の動物実験や小規模の臨床試験では顕在化しづらいため市販後に初めて問題となるケースが多く、スティーブンス・ジョンソン症候群 (SJS)、中毒性表皮壊死症 (TEN)、過敏症症候群 (HSS) 等、重篤度の高い毒性が多い事から、上市後の警告あるいは市場撤退の主要因の一つとなっている⁶⁾。①服用開始から IDT 発現までに数週間程度の時間を要する、②再投与時には急速かつ重篤な症状発現に至る症例が多い、③一部の IDT 発症患者では抗薬物抗体^{7),8)}や薬物特異的な細胞傷害性 T 細胞^{9),10)}が検出されている、といった特徴から IDT 発症には免疫系が関与していると考えられている。特に近年、ゲノムワイド関連解析等の遺伝子解析手法により、多数の薬物について、特定のヒト白血球抗原 (HLA) アレルと IDT 発症との強い遺伝的関連性が見出されている¹¹⁾⁻¹³⁾ (Table 1)。したがって、HLA 分子による抗原提示を薬物が修飾あるいは調節する事により、薬物特異的な免疫反応が惹起され、IDT 発症に至ると推測される。ただし、既報の IDT 発症と特定の HLA アレルとの関連性は、陰性的中率は極めて高い一方で陽性的中率は総じて低く (Table 1)、IDT 回避を目的とした HLA アレルスクリーニングが推奨されているのは、アバカビル-B*57:01²⁸⁾およびカルバマゼピ

Table 1. Associations between HLA alleles/haplotypes and IDTs. HLA alleles/haplotypes strongly associated with IDT of each drug are listed with the odds ratios, negative predictive values (NPVs), positive predictive values (PPVs) and references.

Drug	HLA allele/haplotype	Odds ratio	NPV	PPV	Reference
Co-amoxiclav	DRB1*15:01, DQA1*01:02, DQB1*06:02, A*02:01, B*07:02	15.1	99%	1.1%	14
Lapatinib	DRB1*07:01	17.77	99.5%	7.7%	15
	DQA1*02:01	9.0	97%	17%	16
	DRB1*07:01, DQA1*02:01	-	99.92%	0.56%	17
Ximelagatran	DRB1*07:01	4.4-32	95-96%	19-59%	14
	DQA1*02	4.41	-	-	18
Lumiracoxib	DRB1*15:01	7.5	98.9%	8.0%	19
	DQB1*06:02	6.9	98.8%	7.7%	
	DRB5*01:01	7.2	98.9%	7.7%	
	DQA1*01:02	6.3	99.0%	5.8%	
Flucloxacillin	B*57:01	108.3	99%	0.12%	14
Ticlopidine	A*33:03	13	98%	17%	14
Nevirapine	C*04:01 (SJS/TEN, HSS)	5.17	99.2%	2.6%	20
	B*35:05 (Rash)	18.96	-	-	21
	DRB1*01:01 (DILI)	5.5	96%	40%	22
Carbamazepine	B*15:02 (SJS)	54.76	99.96%	1.92%	23
	A*31:01 (HSS)	113.4	100%	1.8%	24
Allopurinol	B*58:01	580.3	100%	2.0%	25
Abacavir	B*57:01	1141	100%	47.9%	26,27

ン-B*15:02²³)の2例のみに留まっている。したがって、HLA分子を介した薬物特異的な抗原提示のみならず、その他多数の因子が複雑に関与する事で初めて IDT 発症に至ると考えられる。

特に、免疫寛容性臓器²⁹⁾である肝臓においては、酸化ストレスやミトコンドリア障害、bile salt export pump (BSEP) 阻害等による肝細胞への直接的なダメージのみでは肝臓本来の適応機構によりダメージは軽減され、多くの場合、軽度の中毒性または非免疫性毒性に留まると考えられている³⁰⁾。また、IDT 予測因子としての HLA アレルの陽性的中率の低さ (Table 1) から、薬物と HLA 分子との相互作用を介した免疫系活性化が生じた場合でも、通常は軽度の獲得免疫反応に留まり、やがて免疫寛容獲得に至ると考えられる³¹⁾。したがって、重篤な特異体質性薬物性肝障害 (IDILI) 発症には肝臓の免疫寛容を破綻させる必要があり、傷害された肝細胞から放出された”danger signal”によって、HLA 分子を介した薬物特異的な免疫反応が強力に感作された場合に初めて免疫寛容が破綻し、重篤な IDILI 発症に至ると考えられる³⁰⁾⁻³²⁾ (Figure 1)。

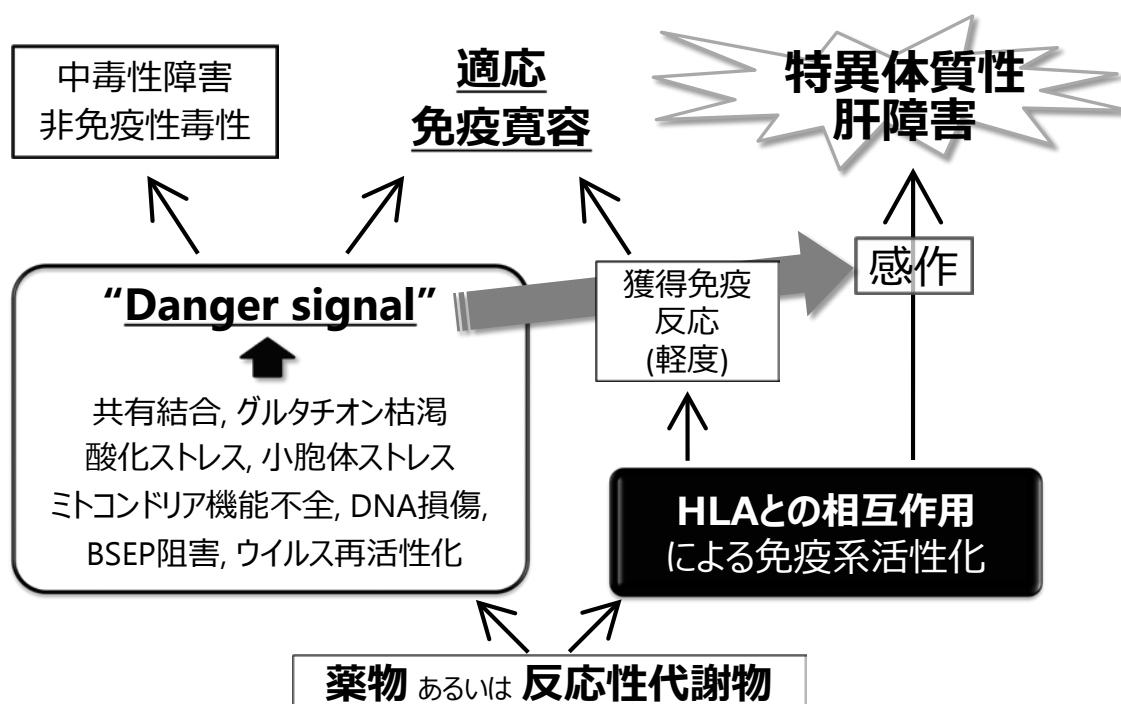


Figure 1. Hypothetical mechanism of IDILI.

”Danger signal”の原因となる肝細胞傷害メカニズムの多くについては、既に *in vitro* 評価系が確立されており³³⁾⁻³⁹⁾、創薬過程でスクリーニング評価を行う事により、可能な限

り肝細胞傷害性ポテンシャルを低減させた薬物が臨床試験に進んでいる。一方、HLA 分子と薬物の相互作用は IDT 発症のトリガーとして極めて重要と考えられるにもかかわらず、未だに確立された評価系は存在せず、薬物毎に HLA 分子との相互作用メカニズムが報告されるに留まっている。これまでに提唱された HLA 分子と薬物の相互作用メカニズムは、主に以下の 3 種類である (Figure 2)。

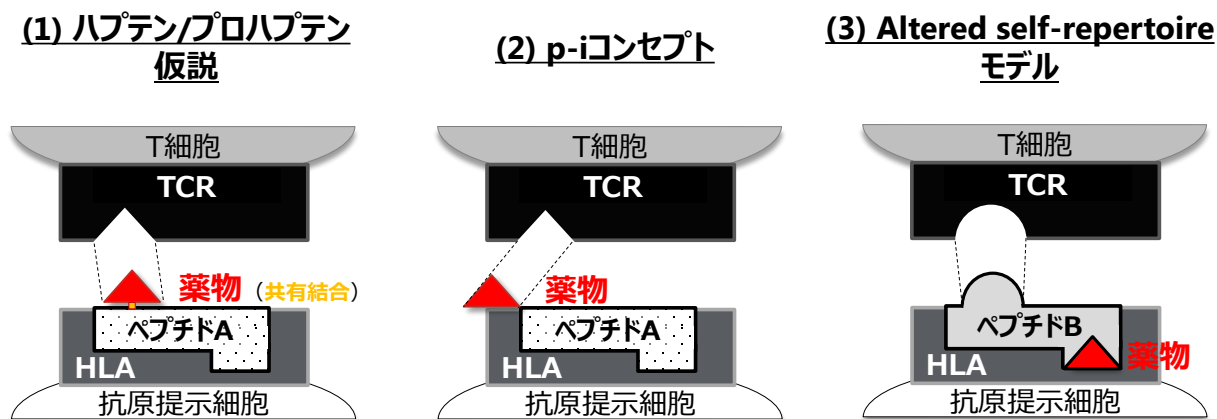


Figure 2. Possible mechanisms of T-cell activation by IDT-causing drugs.

(1) ハプテン/プロハプテン仮説

薬物または活性代謝物がハプテンとして生体内タンパク質に共有結合し、HLA 分子に提示される抗原ペプチドを修飾してネオ抗原を生み出す事により、特異的な免疫反応を惹起するメカニズムである。接触性過敏症⁴⁰⁾や β ラクタム系抗菌薬に対する過敏症⁴¹⁾⁻⁴³⁾は本メカニズムに基づくと考えられている。

(2) Pharmacological interaction with immune receptors (p-i) コンセプト

細胞表面の HLA-抗原ペプチド複合体あるいは T 細胞受容体 (TCR) 分子に薬物が非共有結合的に直接相互作用する事によりネオ抗原を生成し、免疫系を活性化させるメカニズムである⁴⁴⁾。ネオ抗原生成に抗原プロセッシングが不要なため、*in vitro* では薬物添加後速やかに T 細胞の活性化が認められ、洗浄により活性化は消失する。ベリリウム過敏症⁴⁵⁾、カルバマゼピンによる SJS/TEN^{46),47)}およびアロプリノールによる皮膚障害⁴⁸⁾は HLA 分子との直接相互作用、スルファメトキサゾール過敏症⁴⁹⁾は TCR 分子との直接相互作用による免疫系活性化に基づくと考えられている。

(3) Altered self-repertoire モデル

HLA 分子のペプチド結合溝底面に薬物が非共有結合的に結合し、ペプチド結合溝構造を修飾する事によって、HLA 分子に提示される抗原ペプチドレパートリーに変化を及ぼし、薬物特異的な HLA-抗原ペプチド複合体の形成を介して免疫反応を惹起するメカニズムである。アバカビル HSS は最もメカニズム研究が進んだ IDT の一つであり、アバカビルが HLA-B*57:01 ペプチド結合溝の F ポケットに特異的に結合する事、さらにアバカビル特異的な新規抗原ペプチドがアバカビルの上に載る形で HLA-B*57:01 ペプチド結合溝に提示される事が、X 線結晶構造解析で示されている⁵⁰⁾⁻⁵²⁾。

2000 年代前半までは、低分子化合物はそれ自身では免疫原性を持たないという考えから、低分子薬物による HLA 分子を介した免疫系活性化メカニズムとしては、(1)ハプテン/プロハプテン仮説が主流であった。そのため、多くの製薬会社において、IDT リスク評価あるいはスクリーニング評価として、ヒト肝細胞を用いた共有結合試験³⁴⁾やグルタチオンを用いたトラッピング試験³⁵⁾が行われている。しかし近年では、低分子化合物自身と HLA あるいは TCR 分子との直接相互作用による免疫系活性化メカニズムを示唆する報告が増えており⁴⁴⁾⁻⁵²⁾、生体内タンパク質との共有結合を介さない(2)p-i コンセプトおよび(3)altered self-repertoire モデルが注目されている。残念ながら、これらのメカニズムに基づく IDT 発症リスクは現状の評価系では全くカバー出来ておらず、IDT 発症による患者ならびに企業への多大な損害を回避するためには、新規 IDT リスク評価系の確立が急務である。そこで本研究では、創薬過程でのスクリーニング評価として活用可能な「薬物と HLA 分子との相互作用を介した新規 IDT リスク評価系の構築」を最終目標として掲げる事とした。その第一歩として本研究では、上述の通り、医薬品開発におけるインパクトが極めて大きい DILI にフォーカスする事とした。

しかし、上記の様な薬物と HLA 分子との相互作用メカニズムに関する研究は、オッズ比が高い HLA クラス I を対象とした皮膚障害 (SJS/TEN, HSS 等) についての研究が大半を占め、オッズ比が低い HLA クラス II を対象とした IDILI に関する研究事例は非常に少ないのが現状である。そこで本研究では、まず IDILI 発症薬物と HLA クラス II 分

子との相互作用メカニズムについて検討を行う事とした。そして得られた結果に基づき、メカニズム検討に用いた各種評価系の新規 IDT リスク評価系としての有用性を評価する事とした。評価系としては、最終目標であるスクリーニング評価としての活用を見据えたスループット、ならびに無数に存在する HLA アレルの網羅性を考慮し、①ドッキングシミュレーション、②分子動力学 (MD) シミュレーション、③*in vitro* ペプチド結合試験の 3 種類を選択した。また、評価薬物としては、いずれも特定の HLA クラス II と関連した IDILI 発症が報告されているネビラピン²²⁾、キシメラガトラン¹⁸⁾、ラパチニブ¹⁵⁾を選択した。第 1 章ではネビラピンと HLA-DRB1*01:01 との相互作用、第 2 章ではキシメラガトランと HLA-DRB1*07:01 との相互作用、第 3 章ではラパチニブと HLA-DRB1*07:01 との相互作用に関して *in silico* および *in vitro* 評価を行った。そして第 4 章として、メカニズム検討に用いた 3 種類の評価方法について、新規 IDT リスク評価系としての有用性について考察した。

実験方法

1) ドッキングシミュレーション

HLA-DRB1*01:01 および DRB1*15:01 タンパク質の 3 次元立体構造は Protein Data Bank⁵³⁾に登録されている X 線結晶解析データ (PDB ID: 3PDO および 1BX2) に基づき作成した。HLA-DRB1*07:01 の X 線結晶構造は報告されていないため、PDB ID: 3PDO および 1H15 を鋳型として、HLA-Modeler⁵⁴⁾ (菱化システム) を用いたホモロジーモデリングにより作成した。各薬物の構造情報は DrugBank⁵⁵⁾より取得した。全ての計算は総合計算化学システム MOE⁵⁶⁾ (Chemical Computing Group Inc.) を使い、ドッキング計算にはプログラム ASEDock⁵⁷⁾を使用した。ペプチド結合溝におけるリガンド結合可能部位は Alpha Site Finder により Figure 3 に示す様なアルファ球の集合として表現された。ペプチド結合溝を N サイト (P1-P3 を含む) および C サイト (P4-P9 を含む) に分け、両サイトを対象としてドッキングを行い、薬物の結合親和性および結合様式を求めた。最適構造の評価関数として結合自由エネルギーに相当する GBVI/WSA_dG⁵⁸⁾を採用した。

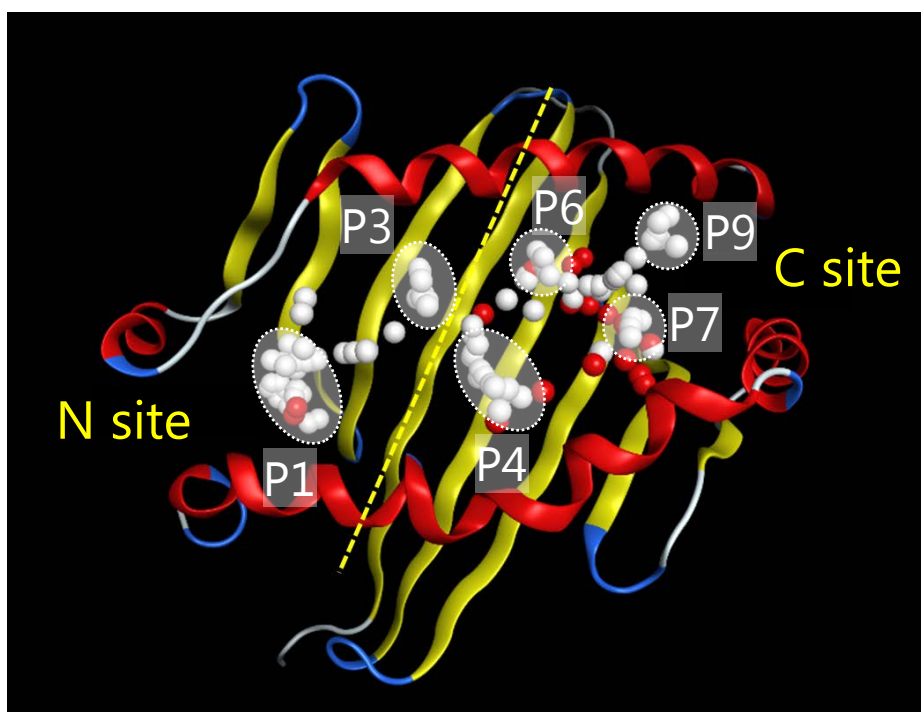


Figure 3. Representative alpha spheres generated at a concavity in the peptide binding groove of HLA-DR molecules. The white and red alpha spheres represent hydrophobic and hydrophilic positions, respectively. The binding groove is divided into sites N and C.

2) 分子動力学シミュレーション

HLA-DRB1*01:01 および DRB1*15:01 タンパク質の 3 次元構造は PDB ID: 1AQD および 1BX2 に基づき作成し、HLA-DRB1*07:01 の 3 次元構造は PDB ID: 1AQD (α 鎖) および 1BX2 (β 鎖) を鋳型としたホモロジーモデリングにより作成した。各 HLA アレルに対するリガンドペプチドとして Table 2 に示すペプチドを選択し、ヘマグルチニン (HA; 306-318) ペプチドは PDB ID: 1DLH、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP; 84-102) ペプチドは PDB ID: 1BX2 および 1FV1 を鋳型としたホモロジーモデリングにより構造を作成した。破傷風菌由来毒素 (TT; 830-844) ペプチドは鋳型となる適切な PDB 構造が存在しないため、Visual Molecular Dynamics ソフトウェア⁵⁹⁾の Molefactory プラグインを用いた *de novo* 合成により構造を作成した。

Table 2. Ligand peptides used in MD simulations.

HLA allele	Origin of peptide	Sequence	Test frame
DRB1*01:01	Haemagglutinin 306-318	PRYVKQNTLKLAT	2,3,4
DRB1*07:01	Tetanus toxin 830-844	QYIKANSKFIGITEL	1,2,3
DRB1*15:01	Myelin basic protein 84-102	NPVVHFFKNIVTPRTPPPS	2,3,4,7

MD シミュレーションには ACEMD ソフトウェア⁶⁰⁾ (Acellera) を用いた。はじめに、各 HLA タンパク質複合体の立体構造から水分子およびイオンを取り除き、pH 7.4 でプロトン化を行った。続いて、最近接の溶質原子からの距離が 10 Å となる様に TIP3P 水ボックスを配置して水和を行った後、ナトリウムイオンを用いてモデル全体の電荷を 0 にした。力場は CHARMM を採用し、シミュレーションには周期境界条件を用いた。エネルギーの極小化を行った後、シミュレーション系の温度を 300 K まで徐々に上げて平衡化し、一定の温度および体積を維持する NVT アンサンブル条件下で MD シミュレーションを行った。積分時間ステップは 4 フェムト秒とした。最終 1000 フレームの平均構造に最も近いフレーム構造を根平均二乗変位 (RMSD) に基づき決定し、各シミュレーションにおける”代表構造”として評価した。各 HLA アレル、薬物毎に以下の 4 種類のシミュレーションを実施した。

① アポ体

各 HLA タンパク質複合体構造から抗原ペプチドを除去し、10 ナノ秒 (ns) 間のシミュレーションを行った。HLA-DRB1*07:01 のみ 10 ns を追加して 20 ns のシミュレーションを行った。

② HLA-リガンドペプチド複合体

各 HLA タンパク質複合体に含まれる抗原ペプチドをホモロジーモデリングにて作成したリガンドペプチド (Table 2) と置換してシミュレーションの開始構造とした。HLA-DRB1*01:01 および DRB1*15:01 については、鋳型ペプチドと同様にフレーム 3 (N 末端から 3 番目のアミノ酸残基が HLA ペプチド結合溝の P1 ポケットに結合するコンフォメーション) でリガンドペプチドを配置した。ホモロジーモデリングで作成した HLA-DRB1*07:01 の立体構造には抗原ペプチドが含まれないため、はじめに PDB ID: 1DLH に含まれる抗原ペプチド (PKYVKQNTLKLAT) を HLA-DRB1*07:01 ペプチド結合溝にフレーム 3 で配置し、続いて両ペプチドのチロシン残基が同様な空間位置を取る様に、かつその他部分で立体障害が起こらない様に、フレーム 2 で TT ペプチドを配置した。ペプチド結合位置の妥当性を検証するため、上記のペプチド結合フレームから、ペプチド結合溝に沿ってスライドさせたフレーム (Table 2) を開始構造とし、それぞれ 5 ns のシミュレーションを行った。X 線結晶構造のペプチド結合フレームとの整合性、シミュレーション系全体のエネルギー的安定性、リガンドペプチドの根平均二乗揺らぎ (RMSF) および HLA ペプチド結合溝との結合性を総合的に考慮して、3 者複合体のシミュレーションに用いる開始フレームを決定した。

③ HLA-薬物複合体

AutoDock Vina⁶¹⁾を用いたドッキングでトップスコアを示したコンフォメーションを開始構造として、5 ns のシミュレーションを行った。

④ HLA-薬物-リガンドペプチド 3 者複合体

HLA-薬物複合体および HLA-リガンドペプチド複合体の MD シミュレーションにおける”代表構造”を組み合わせ、HLA-薬物-リガンドペプチド 3 者複合体シミュレー

シヨンの開始位置とした。薬物とリガンドペプチドの立体障害を避けるため、リガンドペプチドの配置を垂直方向に 3 Å から 4 Å 程度調節して 5 ns のシミュレーションを行った。いずれの複合体においても、シミュレーション開始後速やかにこのシフトは解消され、リガンドペプチドは HLA ペプチド結合溝と相互作用した。

3) *In vitro* ペプチド結合試験

3 種類の HLA クラス II タンパク質 (DRB1*01:01、DRB1*07:01、DRB1*15:01 ; いずれも HLA-DRA とのヘテロ二量体) は Benaroya Research Institute より入手した。Table 3 に示す 6 種類のペプチドはライフテクノロジーズジャパン株式会社にて合成し、陽性および陰性対照として用いた。3 種類の陽性対照ペプチドの N 末端に 2 分子の 6-アミノカプロン酸を介してビオチン標識したプローブペプチドは、ライフテクノロジーズジャパン株式会社にて合成した。ネビラピン (SRP03408n) は Sequoia Research Products Ltd. より、キシメラガトラン (sc-208491) は Santa Cruz Biotechnology, Inc. より、ラパチニブ (L-4899、フリー体) は LC Laboratories, Inc. より購入した。その他の試薬は、市販の特級、一級、HPLC 用のものを用いた。

Table 3. Peptides used in the *in vitro* peptide binding study.

	HLA allele	Origin of peptide	Sequence
Positive control	DRB1*01:01	Haemagglutinin 306-318	PRYVKQNTLKLAT
	DRB1*07:01	Tetanus toxin 830-844	QYIKANSKFIGITEL
	DRB1*15:01	Myelin basic protein 84-102	NPVVHFFKNIVTPRTPPPS
Negative Control	DRB1*01:01	Herpes simplex virus type 2 glycoprotein B 876-893	VTNMVLRKRNKARYSPLH
	DRB1*07:01	Ovalbumin 323-339	ISQAVHAAHAEINEAGR
	DRB1*15:01	Ovalbumin 323-339	ISQAVHAAHAEINEAGR

既報の方法⁶²⁾に若干の修正を加え、以下の通り実験を行った。各薬物およびプローブペプチドはジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、150 mM クエン酸リン酸緩衝液 (CPB、pH 5.4) を用いて 25 倍希釈して薬物溶液およびプローブペプチド溶液とした。各 HLA タンパク質は 1.5% n-Octyl-β-D-glucopyranoside (和光純薬工業株式会社) および 1 mM Pefabloc[®] SC (Sigma-Aldrich Co. LLC.) 含有 CPB (pH 5.4) を用いて希釈し、HLA 溶

液とした。HLA 溶液、プローブペプチド溶液および薬物溶液を混合し、37°C で 24 時間から 48 時間インキュベーションした。なお、各プローブペプチド濃度は各 HLA タンパク質に対する解離定数以下に設定した。96 well プレートに抗 HLA-DR 抗体 (L243, BioLegend, Inc.) を固相化し、0.5% ウシ胎児血清含有リン酸緩衝液 (pH 7.4) でブロッキングした後、0.75% n-Octyl- β -D-glucopyranoside 含有 50 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) を用いて中和したインキュベーション溶液を添加し、4°C で一晩インキュベーションすることにより、HLA タンパク質-プローブペプチド複合体を捕捉した。0.05% Tween 20 含有リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 5 回洗浄後、ユーロピウム標識ストレプトアビジン (Perkin-Elmer, Inc.) を添加し、室温で 1 時間インキュベーションした。洗浄後、DELFI enhancement solution (Perkin-Elmer, Inc.) を添加し、遮光下にて室温で 20 分間インキュベーションした後、SpectraMax M5 マイクロプレートリーダー (Molecular Devices, LLC.) もしくは EnVision マイクロプレートリーダー (Perkin-Elmer, Inc.) を用いた時間分解蛍光法 (励起波長 320 nm、蛍光波長 615 nm) により、HLA タンパク質に結合したプローブペプチドを検出した。得られた蛍光カウントについて、DMSO 添加群を対照群としてダネット検定を行い、 $P < 0.05$ を統計学的有意とした。

ネビラピンおよびキシメラガトランの検討においては、上記サンプルの一部を別の抗 HLA-DR 抗体固相化プレートに移して HLA タンパク質複合体を捕捉し、洗浄後、アセトニトリルを用いて HLA タンパク質に結合した薬物を抽出した。Table 4 に示す分析条件にて、液体クロマトグラフィータンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて抽出液中の薬物濃度を定量した。ニフルミン酸 (IS; 0.05 μ M) を内部標準物質として用いた。抽出液中薬物濃度について t 検定を行い、 $P < 0.05$ を統計学的有意とした。

Table 4. LC-MS/MS conditions.

HPLC system	Prominence LC-20A system (Shimadzu Corp.)				
MS/MS system	API 4000 LC-MS/MS system (AB Sciex Pte. Ltd)				
Column	Shim-pack XR-ODS (2.2 μ m, 30 \times 2 mm) (Shimadzu GLC Ltd.)				
Column oven temp.	40°C				
Sample cooler temp.	4°C				
Injection volume	3 μ L				
Mobile phase A	H ₂ O/100 mM CH ₃ CO ₂ NH ₄ /CH ₃ CN (900/50/50, v/v/v)				
Mobile phase B	CH ₃ CN/100 mM CH ₃ CO ₂ NH ₄ (1000/50, v/v)				
Flow rate	0.75 mL/min				
Ionization mode	Electrospray ionization-positive				
Gradient table	Time (min)	0	0.5	1.0	1.75
	B (%)	50	50	100	100
Monitoring ion	[Nevirapine] m/z 267.1 \rightarrow 226.1				
	[Ximelagatran] m/z 474.0 \rightarrow 198.0				
	[IS] m/z 283.0 \rightarrow 265.0				

第1章 ネビラピンと HLA-DRB1*01:01 の相互作用

1-1. 小序

ネビラピン (商品名ビラミューン、Figure 4) は非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬に分類される経口抗レトロウイルス薬であり、その他の抗レトロウイルス薬との併用により、ヒト免疫不全ウイルス感染症および AIDS の治療に用いられる。WHO 必須医薬品モデルリストに掲載される非常に重要な医薬品であり、概ね良好な忍容性を示すものの、服用患者の約 5%において皮膚障害および DILI を中心とした HSS が認められ^{22),63)-67)}、致死的な副作用として【警告】となっている。服用開始から副作用発現までに数週間を要し、CD4 陽性 T 細胞数が多い患者で副作用発現率が高いといった特徴から、ネビラピン HSS は免疫介在性の副作用と考えられている^{20)-22),65)}。興味深い事に、毒性発現部位によって毒性発現と関連する HLA クラスが異なり、皮膚障害 (SJS/TEN および発疹) では HLA クラス I の C*04:01 や B*35:05 との関連性が見出されている^{20),21),66),67)}一方、DILI では HLA クラス II の DRB1*01:01 が関連遺伝子として報告されている^{22),65),66)}。また、ネビラピンの主代謝酵素の一つである CYP2B6 の遺伝子多型 (G516T) は皮膚障害の毒性発現予測因子となるが、DILI の予測因子にはならない^{66),68)}など、皮膚障害と DILI では根本的に毒性発現メカニズムが異なる事が示唆されている。

本章では、ネビラピンによる IDILI の関連因子である HLA-DRB1*01:01 に着目し、ネビラピンと HLA-DRB1*01:01 との相互作用メカニズムについて検討を行った。

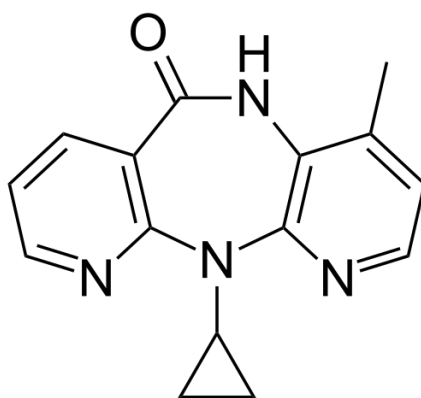


Figure 4. Chemical structure of nevirapine.

1-2. 結果

1-2-1. ドッキングシミュレーション

HLA-DRB1*01:01 ペプチド結合溝に対するネビラピンの結合親和性および相互作用部位を予測する目的で、ドッキングシミュレーションを行った。その結果、ネビラピンは HLA-DRB1*01:01 ペプチド結合溝の P4 ポケット周辺と相互作用する事が示唆された (Figure 5)。ネビラピンと HLA-DRB1*01:01 との間の結合自由エネルギーに相当する GBVI/WSA_dG の最小値は-5.18 kcal/mol であり、ネビラピンによる重症薬疹との関連性が報告されている HLA-B*14:02 について、同評価系で求めた-6.40 kcal/mol⁶⁹⁾よりも高かった。

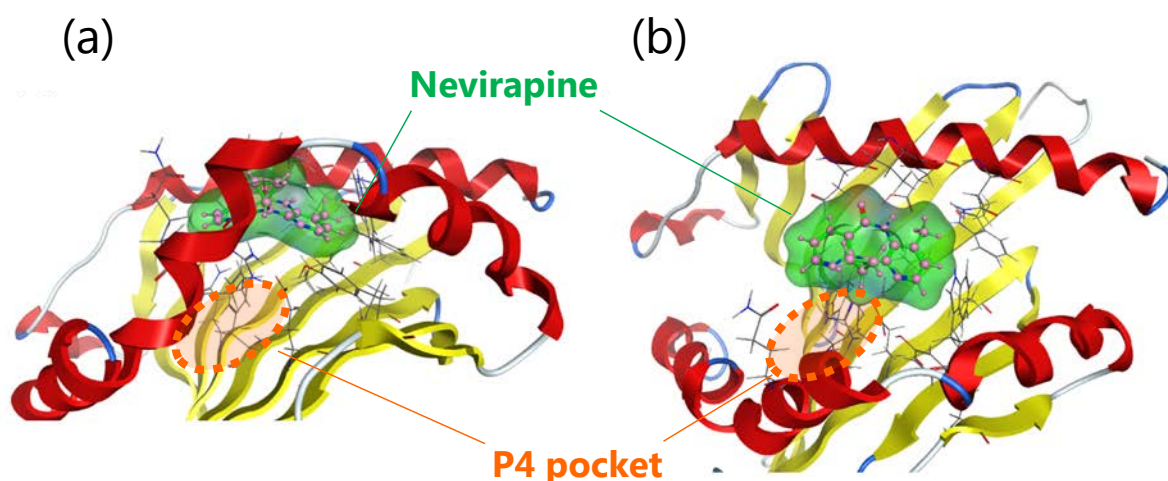


Figure 5. Binding mode of nevirapine to HLA-DRB1*01:01 in docking simulations, (a) side view and (b) top view. The structures of HLA-DRB1*01:01, nevirapine, and amino acid residues of HLA-DRB1*01:01 in the vicinity of nevirapine are depicted in cartoon mode, ball-and-stick model, and wire model, respectively.

1-2-2. 分子動力学シミュレーション

HLA-DRB1*01:01 および HA ペプチドのコンフォメーションに対するネビラピンの影響を評価するため、以下の4種類のMDシミュレーションを行った。なお、①アポ体および②HLA-リガンドペプチド複合体については、第1章から第3章で評価した3種類全てのHLAアレル (DRB1*01:01, DRB1*07:01, DRB1*15:01) について、本項にまとめて結果を示す。

① アポ体

HLA クラス II 分子から抗原ペプチドが外れると、速やかにペプチド結合溝が閉じたペプチド非受容性コンフォメーションを形成する事が知られており⁷⁰⁻⁷²⁾、アポ体の MD シミュレーションにより、本コンフォメーション変化が再現されている⁷³⁾。そこで、シミュレーション系の妥当性を評価する目的で、3 種類の HLA アレルそれぞれについて、アポ体での MD シミュレーションを行った。いずれも系のエネルギー状態はシミュレーション開始後 0.2 ns 以内に安定化し、その後シミュレーションを通じて安定した (Figure 6(a))。各アミノ酸残基の α 炭素の RMSF はアレル間で同等であった (Figure 6(b))。10 ns のシミュレーションを通じて RMSD は経時的に増加し (Figure 6(c))、特にペプチド結合溝を形成する 2 本の α ヘリックス間の距離に変化が認められた (Figure 6(d))。HLA-DRB1*01:01 および DRB1*15:01 ではペプチド結合溝が狭まる変化が認められた一方、HLA-DRB1*07:01 ではペプチド結合溝が広がる変化が認められた。HLA-DRB1*07:01 のみホモロジーモデリングで作成した構造である事を考慮し、10 ns を追加して計 20 ns のシミュレーションを行った結果、最終的に HLA-DRB1*07:01 でもペプチド結合溝が狭まる事を確認した (Figure 7)。各シミュレーションにおける HLA タンパク質の構造変化を Figure 8 に示す。いずれの HLA アレルでも β 鎖 α ヘリックス、特に β 鎖の 66 番目のアミノ酸残基付近で最も大きなコンフォメーション変化が認められた。各シミュレーションにおける系全体のエネルギー、RMSF、ペプチド結合溝サイズおよびそのスロープを Table 5 に示す。いずれの HLA アレルもペプチド結合溝が狭まるコンフォメーション変化が認められ、ペプチド非受容性コンフォメーションへの変化⁷⁰⁻⁷³⁾に相当する結果が得られた事から、本シミュレーション系は妥当であると判断した。

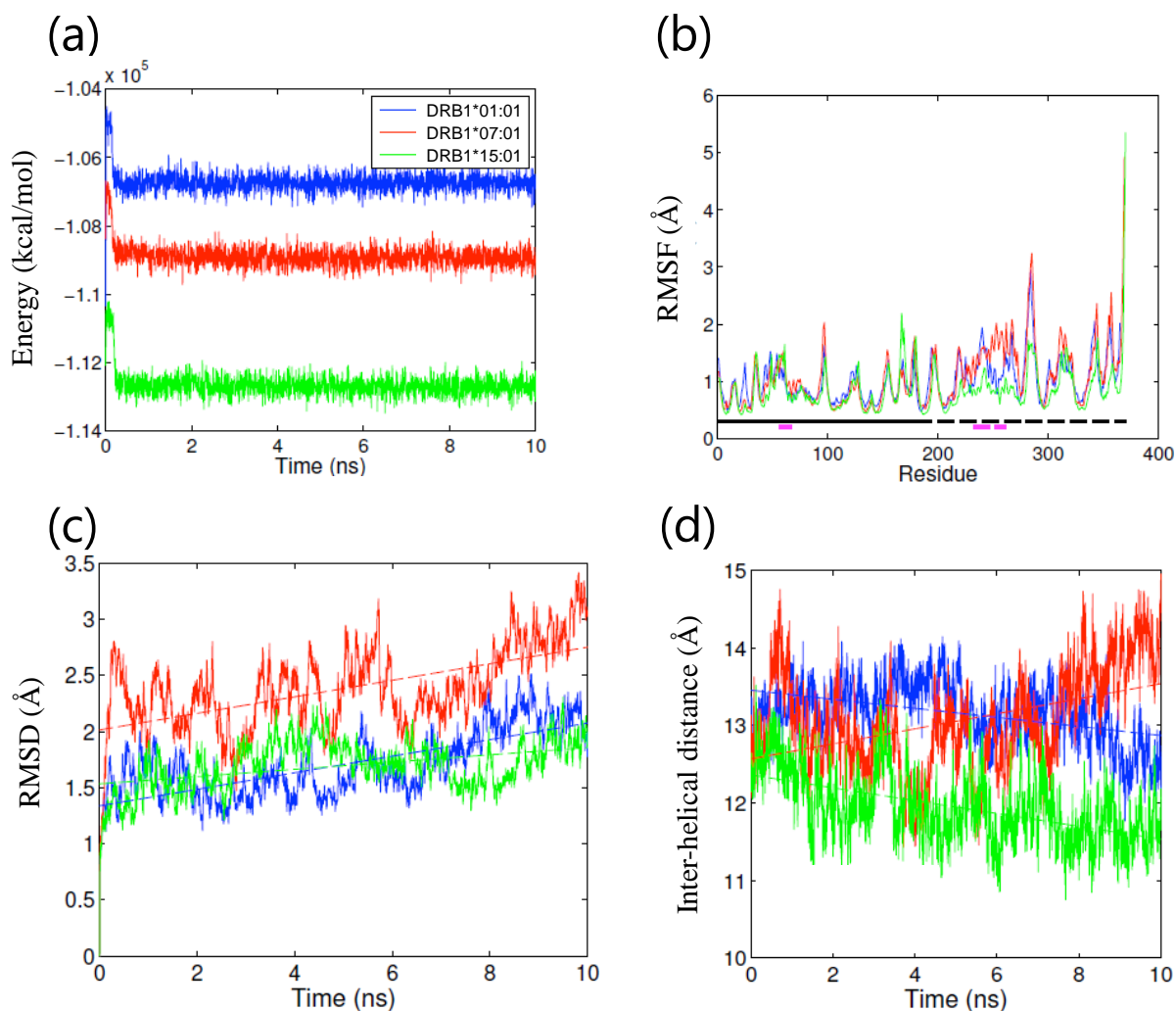


Figure 6. Parameters of MD simulations of apo structures. (a) Calculated energies vs. time plot, (b) RMSF values of polypeptide backbone. The location of α and β chains and residues that comprise the peptide binding groove helices are indicated by the solid and dashed lines running just above the x-axis, respectively. The α chain (solid black), α chain helix (solid purple), β chain (dashed black), and β chain helix (dashed purple). (c) RMSD values of polypeptide backbone vs. time plot and (d) the average distance between each $C\alpha$ in the helix of the α chain and the closest $C\alpha$ in the helix of the β chain.

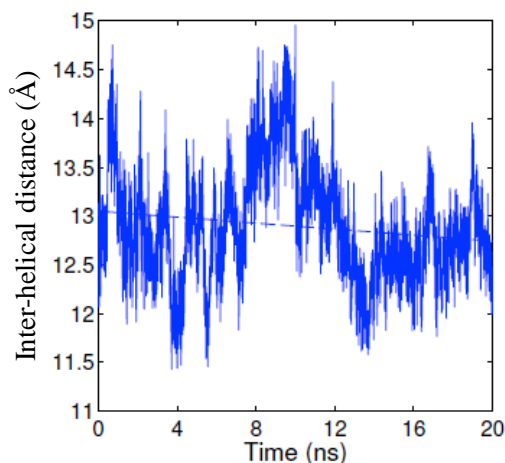


Figure 7. The average inter-helical distance in the extended HLA-DRB1*07:01 apo simulation.

Table 5. Parameters of MD simulations of apo structures (mean \pm standard deviation (SD)).

HLA allele	Energy (kcal/mol)	RMSF (\AA)	Inter-helical distance (\AA)	Slope of inter-helical distance curve ($\text{\AA}/\text{ns}$)
DRB1*01:01	-106715 ± 310	1.0 ± 0.4	13.0 ± 0.4	-0.12
DRB1*07:01	-108900 ± 315	1.1 ± 0.5	12.7 ± 0.4	-0.03
DRB1*15:01	-112657 ± 357	0.9 ± 0.4	11.7 ± 0.4	-0.17

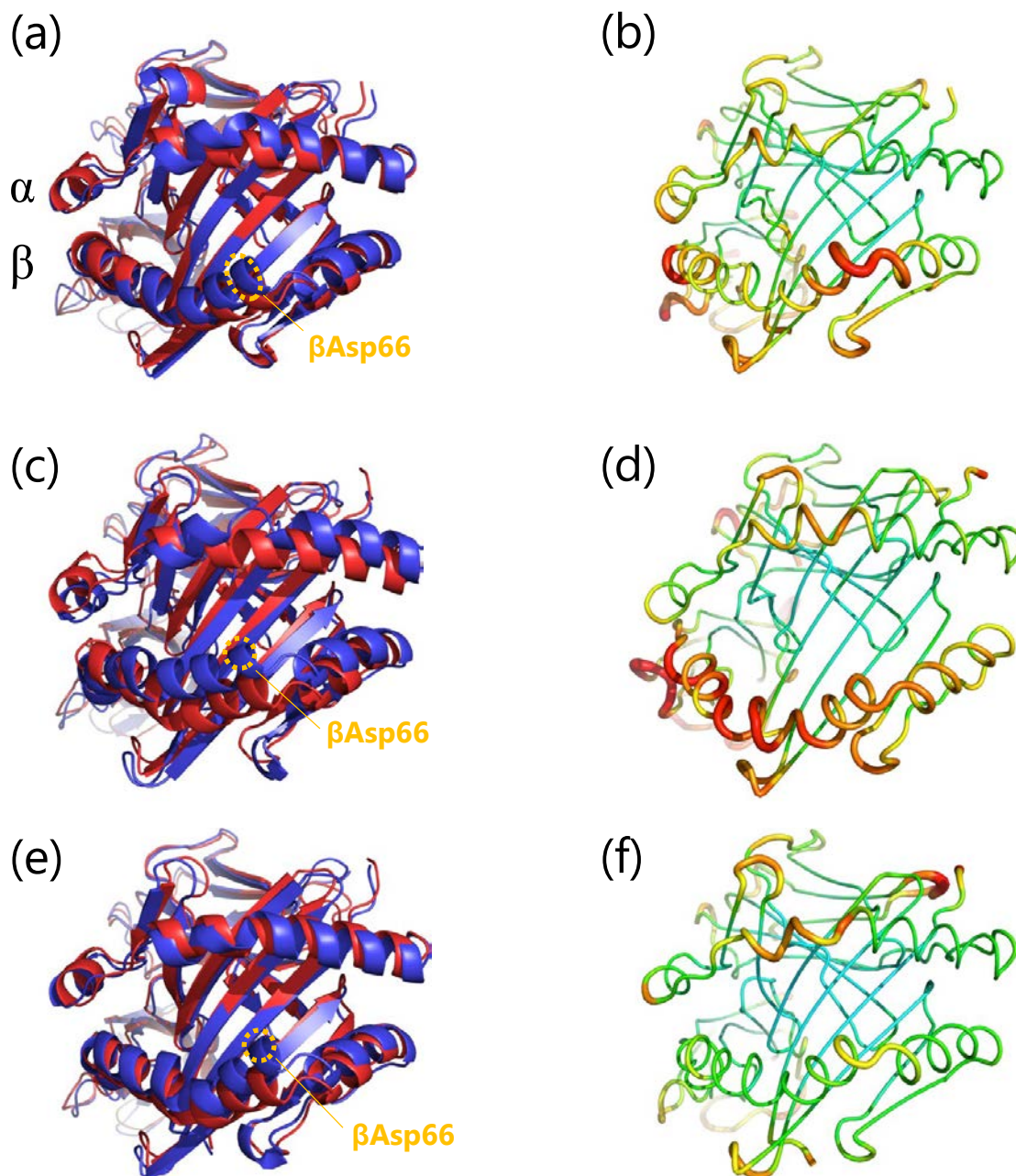


Figure 8. Simulated representative structures of apo structures; HLA-DRB1*01:01 (a,b), HLA-DRB1*07:01 (c,d) and HLA-DRB1*15:01 (e,f). (a,c,e) Alignment of the initial structure (red) and a representative structure (blue), (b,d,f) sausage plot of the structure, where the color and thickness are proportional to the RMSF of $C\alpha$. The range is from 0.0 \AA (blue) to 3.0 \AA (red).

② HLA-リガンドペプチド複合体

3 者複合体シミュレーションの開始位置として適切なペプチド結合フレームを選択するため、また薬物非存在下での HLA-リガンドペプチド複合体構造を予測するために、HLA-リガンドペプチド複合体の MD シミュレーションを行った。全てのシミュレーションにおいて 1 ns 以内に系全体のエネルギー状態は安定化し、その後シミュレーションを通じて安定した (Figure 9(a))。RMSD 平均値の経時変化は HLA アレルおよびペプチド結合フレームによって異なり、HLA-DRB1*07:01-TT ペプチド (フレーム 2) で最も大きな経時変化を示した (Figure 9(b-d))。各アミノ酸残基 α 炭素の RMSF は全てのシミュレーションで同様の傾向を示し (Figure 10(a))、いずれの HLA アレルについても、少なくともいずれかの開始フレームにおいて、アポ体よりも RMSF 平均値は小さくなった (Table 6)。ペプチド結合溝サイズは HLA アレルおよびペプチド結合フレームによって大きく異なり (Figure 10(b-d))、HLA-DRB1*01:01-HA ペプチド (フレーム 2) および HLA-DRB1*07:01-TT ペプチド (フレーム 1) を除く 8 つのシミュレーションではいずれもアポ体よりもペプチド結合溝は広がった (Table 6)。

3 者複合体シミュレーションの開始フレームとして 4 種類の HLA-リガンドペプチド複合体を選択した。各シミュレーションにおける HLA 分子およびリガンドペプチドの構造変化を Figure 11-14 に示す。以下、HLA アレル毎に開始フレームの選択理由を示す。

1. HLA-DRB1*01:01-HA ペプチド複合体

X 線結晶構造 (PDB ID: 1DLH) に最も近いコンフォメーションであり、 α 鎖 β 鎖と HA ペプチドとの良好な相互作用を示したフレーム 3 を選択した (Figure 11)。加えて、ペプチド結合位置のシフトは認められるものの、エネルギー的に最安定であるフレーム 2 を選択した (Figure 12)。

2. HLA-DRB1*07:01-TT ペプチド複合体

フレーム 2 ではペプチド結合溝以外の部分で大きな構造変化が認められ、全体の RMSF が大きく不安定となったため除外した。フレーム 1 はアポ体よりもペプチド結合溝が狭くなり、不自然なコンフォメーションと考えられた。したがって、フレーム 3 を選択した (Figure 13)。

3. HLA-DRB1*15:01-MBP ペプチド複合体

フレーム 3、フレーム 4 共に α 鎖 β 鎖と良好な相互作用を示した。X 線結晶構造 (PDB ID: 1BX2) に最も近いフレーム 3 を選択した (Figure 14)。

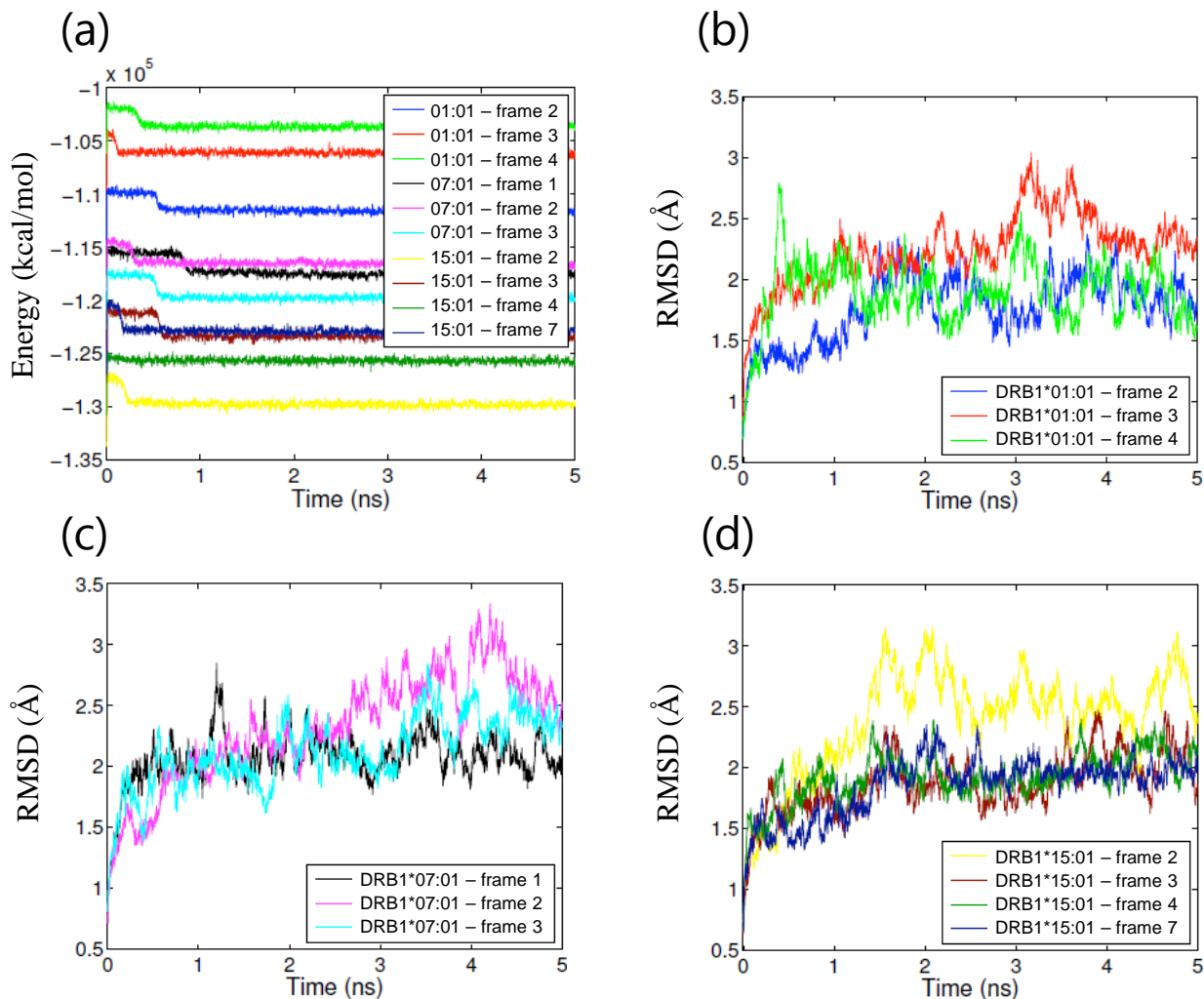


Figure 9. Parameters of MD simulations of HLA-ligand peptide complexes. (a) Calculated energies vs. time plot and (b-d) RMSD values of polypeptide backbone vs. time plot.

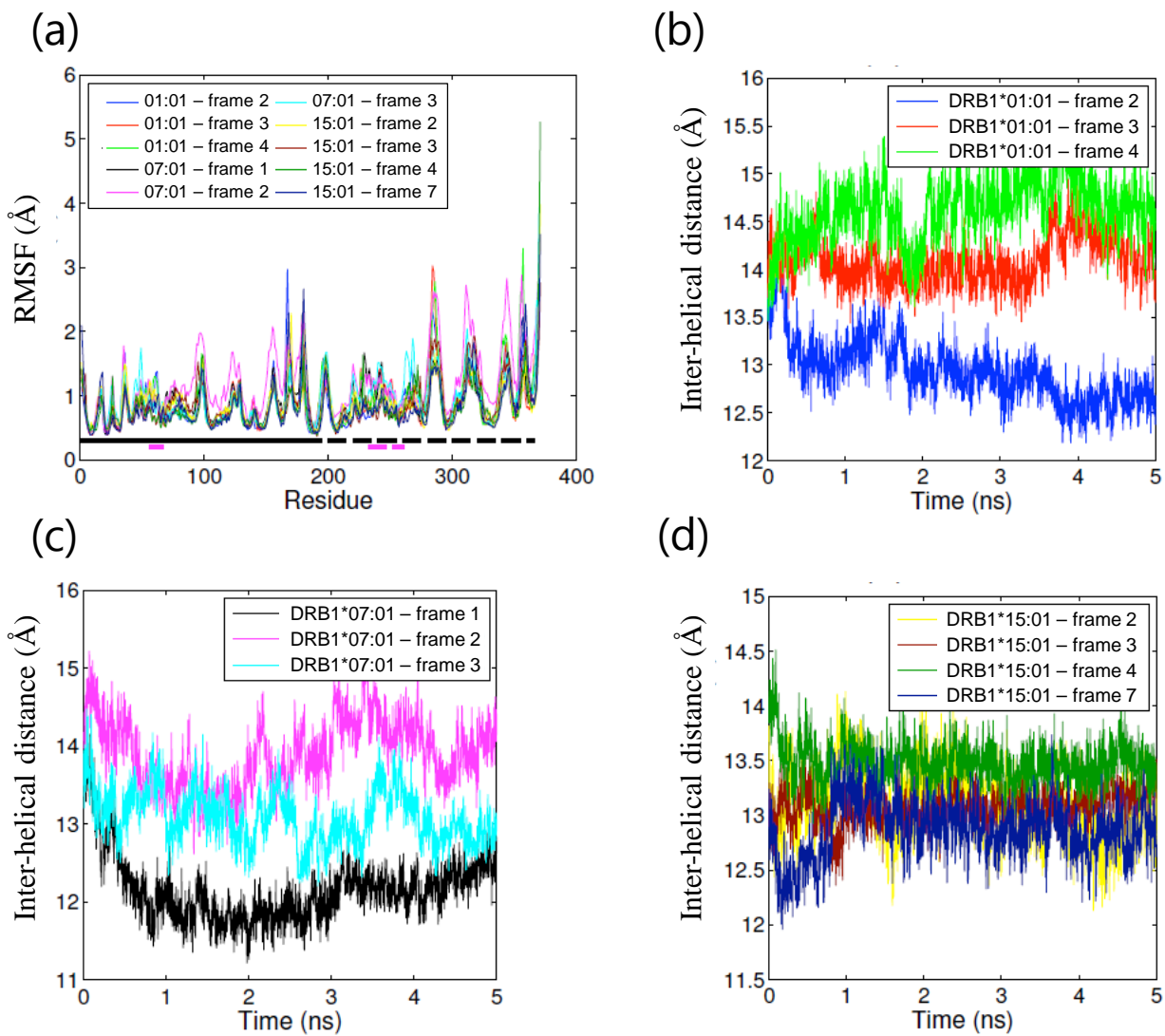


Figure 10. Parameters of MD simulations of HLA-ligand peptide complexes. (a) RMSF values of polypeptide backbone and (b-d) the average inter-helical distance curves.

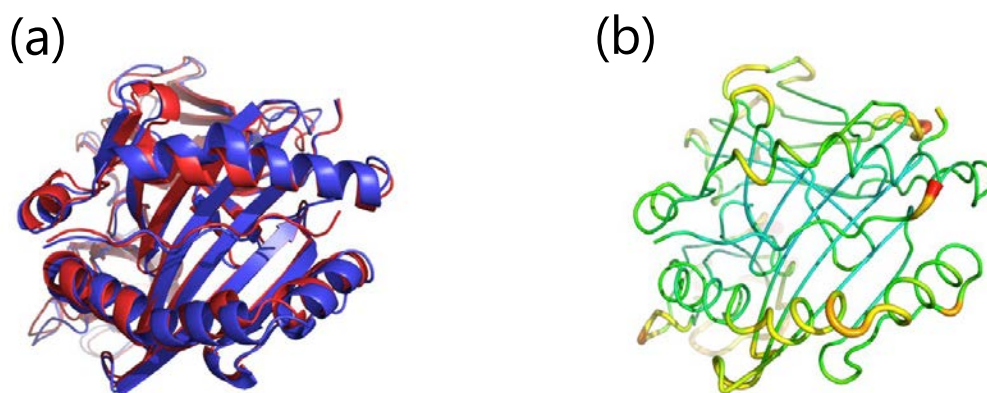


Figure 11. Simulated representative structures of HLA-DRB1*01:01-HA peptide complex in frame 3. (a) Alignment of the initial structure (red) and a representative structure (blue), (b) sausage plot of the structure.

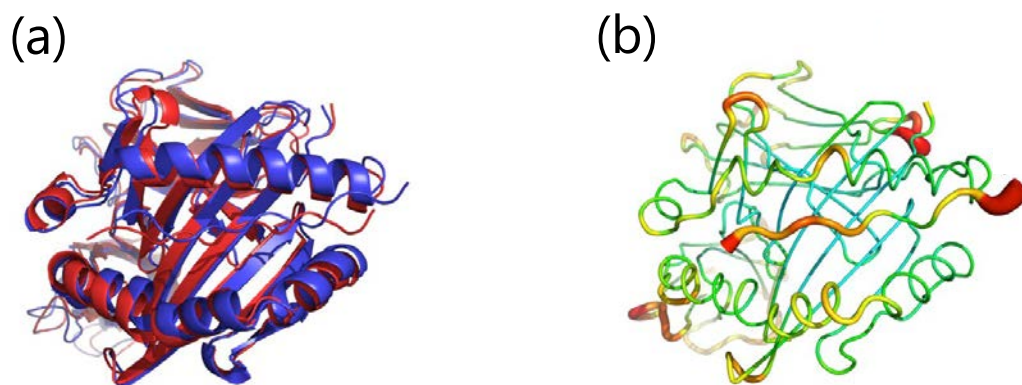


Figure 12. Simulated representative structures of HLA-DRB1*01:01-HA peptide complex in frame 2. (a) Alignment of the initial structure (red) and a representative structure (blue), (b) sausage plot of the structure.

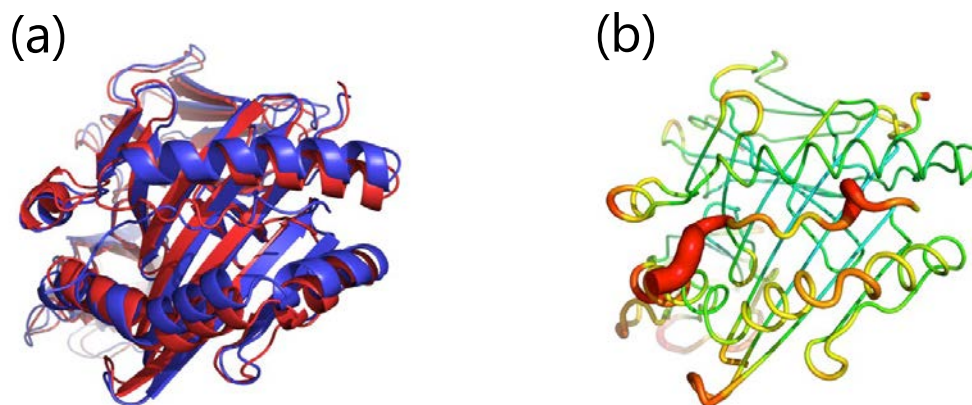


Figure 13. Simulated representative structures of HLA-DRB1*07:01-TT peptide complex in frame 3. (a) Alignment of the initial structure (red) and a representative structure (blue), (b) sausage plot of the structure.

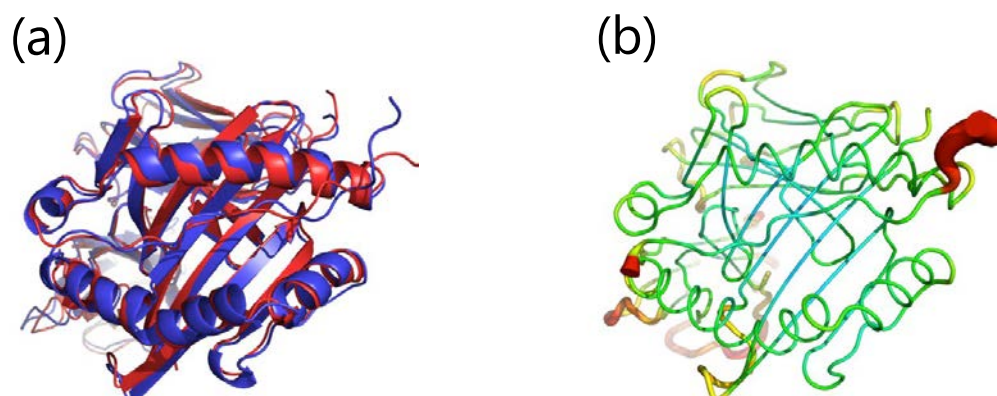


Figure 14. Simulated representative structures of HLA-DRB1*15:01-MBP peptide complex in frame 3. (a) Alignment of the initial structure (red) and a representative structure (blue), (b) sausage plot of the structure.

Table 6. Parameters of MD simulations of HLA-ligand peptide complexes (mean \pm SD).

HLA allele	Ligand peptide	Peptide frame	Energy (kcal/mol)	RMSF (\AA)	Inter-helical distance (\AA)	Slope of inter-helical distance curve ($\text{\AA}/\text{ns}$)
DRB1*01:01	HA	2	-111392 ± 580	0.9 ± 0.4	12.7 ± 0.2	-0.16
		3	-106078 ± 323	0.9 ± 0.3	14.2 ± 0.3	0.04
		4	-103554 ± 479	0.9 ± 0.4	14.8 ± 0.3	0.09
DRB1*07:01	TT	1	-117176 ± 768	0.9 ± 0.3	12.3 ± 0.2	-0.02
		2	-116425 ± 496	1.2 ± 0.5	14.1 ± 0.4	0.06
		3	-119540 ± 689	1.0 ± 0.4	13.0 ± 0.3	-0.08
DRB1*15:01	MBP	2	-129694 ± 518	0.9 ± 0.3	13.0 ± 0.3	-0.08
		3	-123130 ± 746	0.9 ± 0.3	13.1 ± 0.1	0.04
		4	-125663 ± 257	0.8 ± 0.4	13.4 ± 0.2	-0.03
		7	-122828 ± 469	0.8 ± 0.4	12.9 ± 0.2	0.01

③ HLA-DRB1*01:01-ネビラピン複合体

3者複合体シミュレーションの開始位置として適切なネビラピンのコンフォメーションを選択するため、HLA-DRB1*01:01-ネビラピン2者複合体 (HA ペプチド無し) のMDシミュレーションを行った。シミュレーション開始後 0.5 ns 以内に系全体のエネルギー状態は安定化し (Figure 15(a))、RMSD も 1.5 ns 以内に安定化した (Figure 15(c))。ペプチド結合溝サイズはアポ体と同等であり (Figure 15(d)、Table 7)、ペプチド非受容性コンフォメーションに近い構造であると考えられた。ネビラピンはドッキングシミュレーションと同様に、HLA-DRB1*01:01 ペプチド結合溝の P4 ポケット周辺と相互作用する事が示唆された (Figure 16(a,b))。

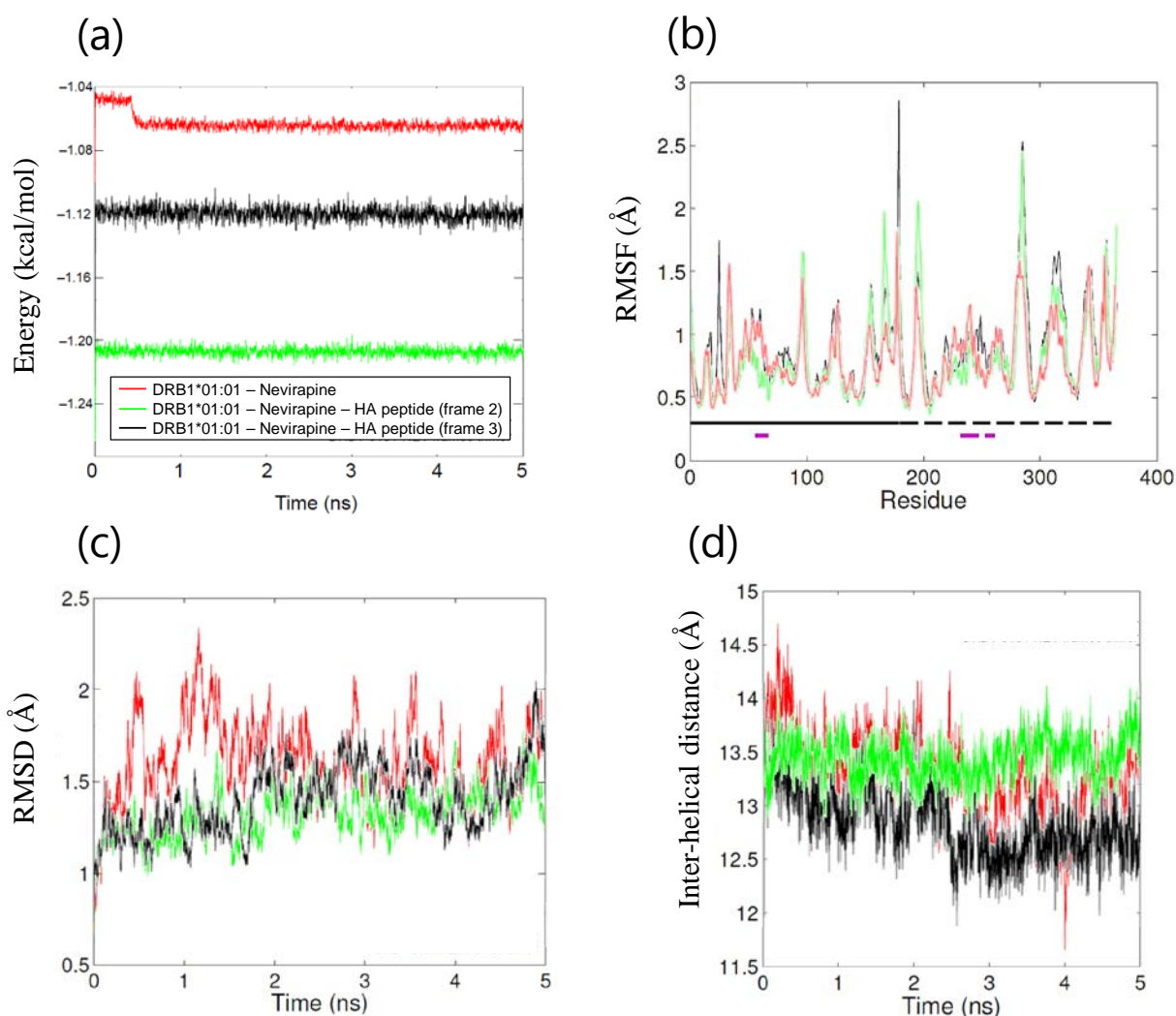


Figure 15. Parameters of MD simulations of HLA-DRB1*01:01-nevirapine complex and HLA-DRB1*01:01-nevirapine-HA peptide trimers. (a) Calculated energies vs. time plot, (b) RMSF values of polypeptide backbone, (c) RMSD values of polypeptide backbone vs. time plot and (d) the average inter-helical distance curves.

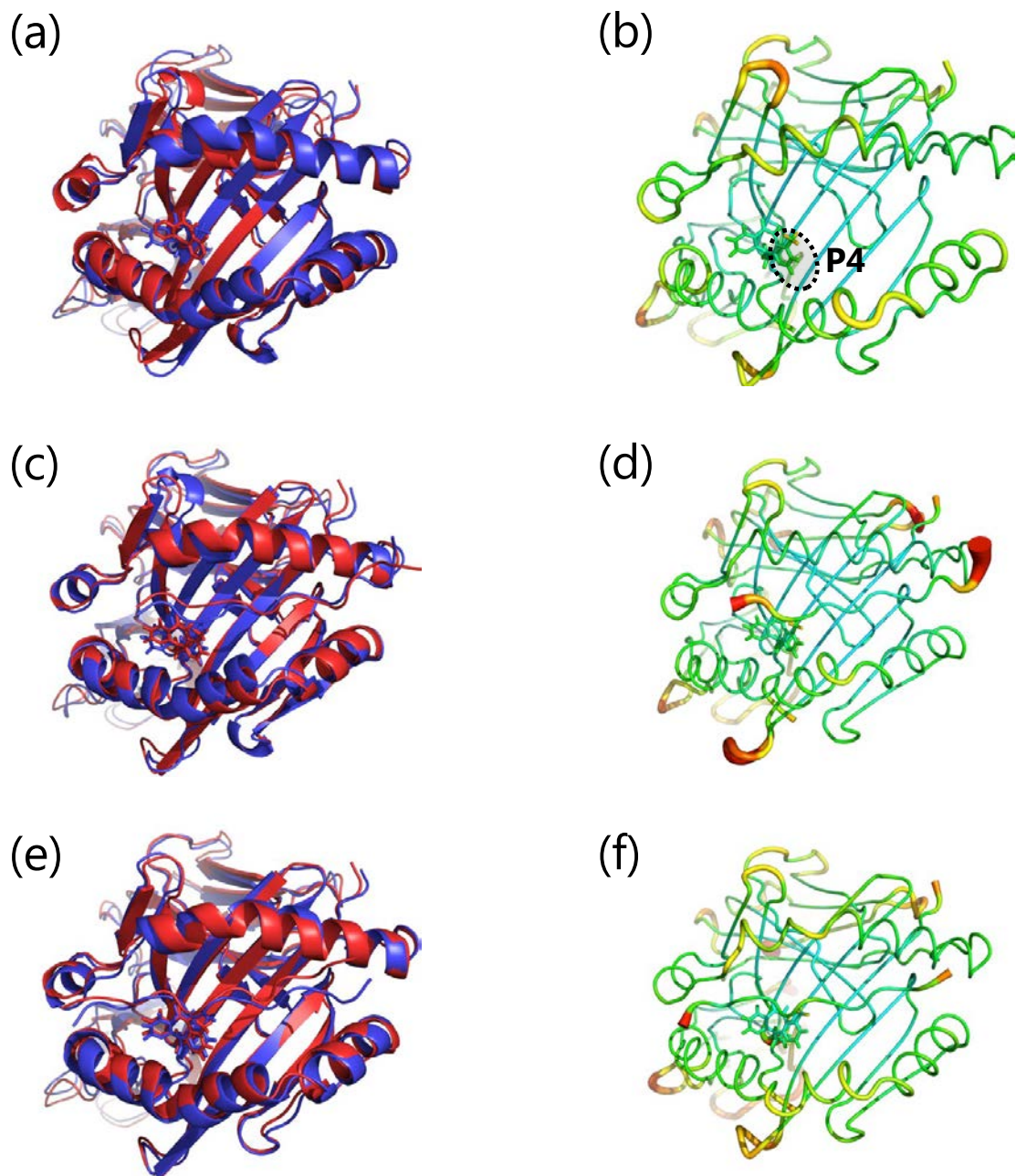


Figure 16. Simulated representative structures of (a,b) HLA-DRB1*01:01-nevirapine complex, (c,d) HLA-DRB1*01:01-nevirapine-HA peptide trimer in frame 2 and (e,f) frame 3. (a,c,e) Alignment of the initial structure (red) and a representative structure (blue), (b,d,f) sausage plot of the structure.

④ HLA-DRB1*01:01-ネビラピン-HA ペプチド 3 者複合体 (フレーム 2 および 3)

HLA-DRB1*01:01-HA ペプチド複合体のコンフォメーションに対するネビラピンの影響を評価する目的で、HLA-DRB1*01:01-ネビラピン-HA ペプチド 3 者複合体の MD シミュレーションを行った。いずれの複合体も系全体のエネルギーは 5 ns のシミュレーションを通じて安定で、各アミノ酸残基の RMSF はその他のシミュレーションと同様であっ

たが (Figure 15(a,b)), アポ体と比較して 3 者複合体では RMSF が小さくなる傾向が認められた (Table 7)。RMSD の経時変化は両フレームで同様に、シミュレーションを通じて緩やかな増加傾向が認められた (Figure 15(c))。一方、ペプチド結合溝サイズの変化は両フレームで異なり、フレーム 2 ではネビラピン共存下でもペプチド結合溝サイズはほとんど変化しなかったが、フレーム 3 では顕著にペプチド結合溝が狭くなるコンフォメーション変化が認められた (Figure 15(d)、Table 7)。両フレーム共にネビラピンの結合ポケットおよびコンフォメーションに大きな変化は無く、ネビラピンが P4 ポケットにはまり込んだ状態で、その上に HA ペプチドが載る形で HLA-DRB1*01:01 と結合する事が示唆された (Figure 16(d,f))。HA ペプチド両末端の揺らぎが小さい事から、フレーム 3 がより安定な構造と考えられた。

Table 7. Parameters of MD simulations of HLA-DRB1*01:01-nevirapine complex and HLA-DRB1*01:01-nevirapine-HA peptide trimers (mean \pm SD).

HLA allele	DRB1*01:01		
Nevirapine	+	+	+
HA peptide frame	-	2	3
Energy (kcal/mol)	-106370 \pm 534	-120550 \pm 244	-112166 \pm 231
RMSF (Å)	0.8 \pm 0.3	0.8 \pm 0.3	0.9 \pm 0.3
Inter-helical distance (Å)	13.1 \pm 0.4	13.5 \pm 0.2	12.6 \pm 0.2
Slope of inter-helical distance curve (Å/ns)	-0.14	0.02	-0.13

1-2-3. *In vitro* ペプチド結合試験

In silico 評価で示唆された HLA-DRB1*01:01 ペプチド結合溝とネビラピンの相互作用を実験的に検証するため、ネビラピン存在下における各 HLA-DR 分子へのプローブペプチド結合量の変化を評価する *in vitro* ペプチド結合試験を実施した。まず、陽性および陰性対照ペプチド (Table 3) を用いて試験系の妥当性を確認したところ、いずれの陽性ペプチドも HLA-DR 分子へのプローブペプチドの結合を阻害し、HA ペプチド、TT ペプチドおよび MBP ペプチドの IC₅₀ はそれぞれ 0.03 μ M、0.41 μ M および 0.004 μ M であった。一方、陰性ペプチドはいずれも阻害作用を示さなかった (IC₅₀ > 100 μ M)。したがって、試験系は成立していると判断した。

HLA-DR 分子へのプローブペプチド結合に対するネビラピンの作用を評価したところ、1000 μM において HA ペプチドの HLA-DRB1*01:01 への結合が有意に増加した事から (Figure 17)、ネビラピンは HLA-DRB1*01:01 と相互作用していると考えられた。一方、TT ペプチドの HLA-DRB1*07:01 への結合量および MBP ペプチドの HLA-DRB1*15:01 への結合量に変化は認められなかった事から、ネビラピンと HLA-DRB1*01:01 の相互作用はアレル選択的と考えられた。しかし本作用が認められたのは 1000 μM のみである事から、その親和性自体は比較的低いと推測された。

LC-MS/MS を用いて HLA 分子に結合したネビラピンの定量を試みたところ、アセトニトリル抽出液中のネビラピン濃度は多くのサンプルで理論的最高値 (4.7 nM) よりも遥かに高く、濃度値のばらつきも非常に大きかった。実験容器等への吸着によると考えられるため、本手法を用いて HLA 分子に結合したネビラピンを定量する事は困難であると判断した。

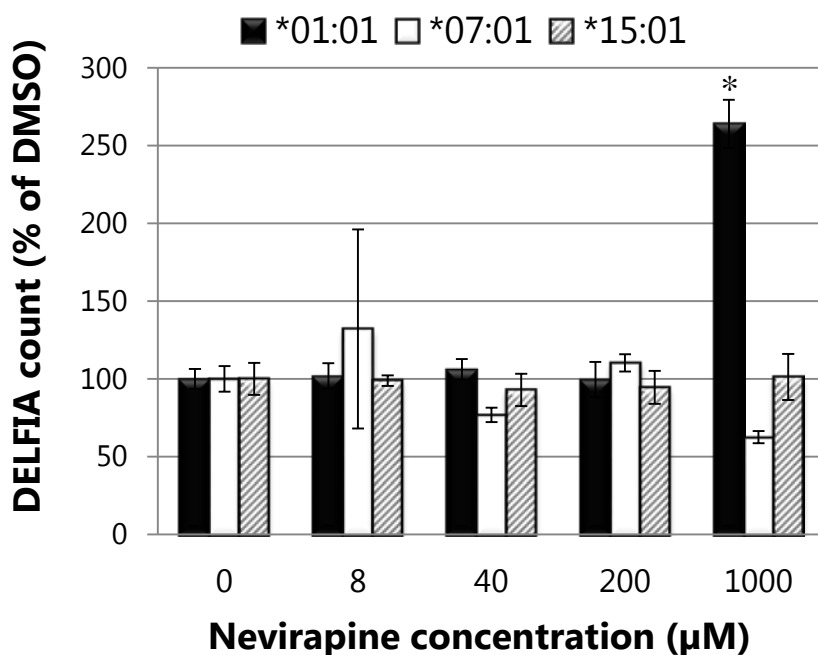


Figure 17. The effect of nevirapine on the binding of probe peptides to HLA-DR molecules. The DELFIA counts in the presence of nevirapine are normalized by that in DMSO control (n = 8). Data represent the mean \pm SD of quadruplicate. *P < 0.05, compared with the DMSO control.

1-3. 考察

ネビラピン HSS の関連因子として同定された HLA アレルは非常に多岐に渡り、また様々な民族集団において見出されている^{20)-23), 65)-67)}。その中で最も多くの民族集団で共通して同定された HLA アレルは、皮膚過敏症関連因子としての C*04:01 である⁷⁴⁾。Pavlos らは HLA ペプチド結合溝ポケットの化学的性質の類似性に着目し、体系的かつアレル横断的な独自の分析手法を用いて、重篤な皮膚過敏症リスクの高い HLA-C アレル (*04:01、*05:01、*18:01) が共通の F ポケットモチーフを有する事を見出した⁷⁴⁾。また、2つのグループから報告された HLA-C*04:01 とネビラピンのドッキングシミュレーションでは、いずれも B ポケットあるいは F ポケットがネビラピンの結合部位として予測されており^{67),74)}、ポケットモチーフ解析結果と合致している。

あわせて Pavlos らは、高リスク HLA-DR アレル (DRB1*01:(01/02/03) および DRB1*04:(04/05/08/10)) が共通の P4 ポケットモチーフを有する事を報告している。本研究のドッキングシミュレーション (Figure 5) および MD シミュレーション (Figure 16) では、いずれもネビラピンが HLA-DRB1*01:01 ペプチド結合溝の P4 ポケット周辺と相互作用する事が示唆されており、Pavlos らの報告と合致する結果である。ただし、ドッキングシミュレーションで予測されたネビラピンと HLA-DRB1*01:01 の結合親和性が、同システムで予測された他の IDT 発症薬物と HLA リスクアレルとの結合親和性^{69),75),76)}と比較して低い点には留意が必要である。

In vitro ペプチド結合試験では、ネビラピンは HLA-DRB1*01:01 選択的に HLA へのプローブペプチドの結合量を増加させたが、本作用が認められたのは評価した最高濃度である 1000 μM のみであった (Figure 17)。低濃度で作用が認められなかった点は、HLA-DRB1*01:01 に対するネビラピンの結合親和性は比較的低いというドッキングシミュレーション結果と合致すると考えられる。しかし、1000 μM という非常に高濃度ではあるものの、明確な HLA-DRB1*01:01 選択性が認められた点は非常に興味深い。

ネビラピン (分子量 266.3) はアバカビル (分子量 286.3) と同様に分子サイズが小さく、MD シミュレーションでは HLA-DRB1*01:01 の P4 ポケットに結合したネビラピン

の上に載る形で HA ペプチドが結合する事が示唆された (Figure 16) 事から、アバカビルと同じく、ネビラピンによる免疫系活性化も”altered self-repertoire”メカニズムに基づくと推測される。しかし、Pavlos らは HLA-DRB1*01:01 を発現させた L2 細胞を用いて、HLA-DRB1*01:01 に提示される抗原ペプチドのレパートリーはネビラピンの影響を受けない事、またネビラピン存在下で HLA-DRB1*01:01 に対する結合親和性が向上するペプチドは見出されなかった事を報告している⁷⁴⁾。この意外な結果を説明し得る要因の一つとして、ドッキングシミュレーションおよび *in vitro* ペプチド結合試験で示唆された、ネビラピンの HLA-DRB1*01:01 に対する結合親和性が比較的低い点が挙げられる。Pavlos らの検討におけるネビラピン濃度は 100 µg/mL (375.5 µM) であり、*in vitro* ペプチド結合試験 (Figure 17) において、HLA-DRB1*01:01 への HA ペプチドの結合量に対する影響が全く認められなかった 200 µM の 2 倍に満たない濃度である。したがって、抗原ペプチドレパートリーあるいは結合親和性に影響を与え得るネビラピン濃度に到達していない可能性が考えられる。

さらに別の可能性として、ネビラピンが抗原ペプチドの結合親和性ではなく HLA-DRB1*01:01 への結合様式、あるいは HLA-DRB1*01:01-抗原ペプチド複合体のコンフォメーションを変化させている可能性が考えられる。すなわち、通常は自己と認識されるペプチドが異なるコンフォメーションで抗原提示される事により、ネオ抗原として認識されるメカニズムである。例えば、アバカビルやアロプリノールによる免疫系活性化メカニズムとして、細胞表面に提示された HLA-自己ペプチド複合体に結合してコンフォメーション変化を誘導する”altered conformation”仮説が”altered self-repertoire”モデルのバリエーションとして提唱されている^{12),48)}。また、ベリリウム中毒の一種である慢性ベリリウム症は HLA-DP2 保有者のみで発症するが、HLA-DP2-抗原ペプチド複合体内部の酸性ポケットにベリリウムイオンが結合する事により、複合体表面の静電ポテンシャルおよびトポロジーが変化し、自己抗原でありながらネオ抗原として特異的な T 細胞に認識されるという発症メカニズムが報告されている⁴⁵⁾。Petukh らはベリリウムの結合による HLA-DP2 ペプチド結合溝サイズの変化を MD シミュレーションで解析し、複合体コンフォメーション変化の指標としている⁷⁷⁾。本研究の MD シミュレーションでは、HLA-

DRB1*01:01-HA ペプチド複合体 (フレーム 3) のペプチド結合溝サイズは、ネビラピンにより $14.2 \pm 0.3 \text{ \AA}$ (Table 6) から $12.6 \pm 0.2 \text{ \AA}$ (Table 7) へと顕著に変化していることから、ネビラピンは抗原ペプチドの結合様式に加えて HLA-DRB1*01:01 のコンフォメーションにも影響を与える事が示唆された。したがって、ネビラピンが HLA-DRB1*01:01 ペプチド結合溝の P4 ポケットに結合する事により、HLA-DRB1*01:01-自己ペプチド複合体のコンフォメーションが変化する”altered conformation”メカニズムが、ネビラピンによる IDILI 発症のトリガーとなると推察される。

1-4. 小括

ネビラピンは HLA-DRB1*01:01 ペプチド結合溝の P4 ポケット周辺と相互作用し、HLA-DRB1*01:01-抗原ペプチド複合体のコンフォメーションに変化を及ぼす事が示唆された。この変化により自己抗原がネオ抗原として T 細胞に認識される事が、ネビラピンによる IDILI 発症のトリガーとなる可能性が考えられる。

第2章 キシメラगतランと HLA-DRB1*07:01 の相互作用

2-1. 小序

キシメラगतラン (Figure 18) は直接トロンビン阻害薬に属する経口抗凝固薬として開発され、非弁膜症性心房細動患者における虚血性脳卒中および全身性塞栓症の発症抑制を適応として、欧州および南米の一部では承認を受けていた。短期投与の忍容性は良好であったものの、35 日間以上の長期投与により 7.9%の患者で血清中アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) の上昇、0.5%の患者で ALT および総ビリルビンの上昇が認められ⁷⁸⁾、2006 年に申請撤回、販売中止、そして全ての臨床試験の中止が発表された。後のゲノムワイド関連解析により、ALT 上昇と HLA-DRB1*07 および DQA1*02 との間に強い遺伝的関連性が見出され、追試でも再現性が確認された³¹⁾。また、*in vitro* において、キシメラगतランがプローブペプチドの HLA-DRB1*07:01 への結合をアレル選択的に阻害する事が報告されている¹⁸⁾。さらに、キシメラगतランがミトコンドリア外膜に存在する酵素 mitochondrial reducing component 2 に依存した酸化ストレスを引き起こす事が報告されており⁷⁹⁾、酸化ストレスによる”danger signal”と HLA-DRB1*07:01 を介した免疫系活性化が組み合わさる事で、IDILI 発症に至ると推測される。

本章では、キシメラगतランによる IDILI の関連因子である HLA-DRB1*07:01 に着目し、キシメラगतランと HLA-DRB1*07:01 の相互作用メカニズムについて検討を行った。

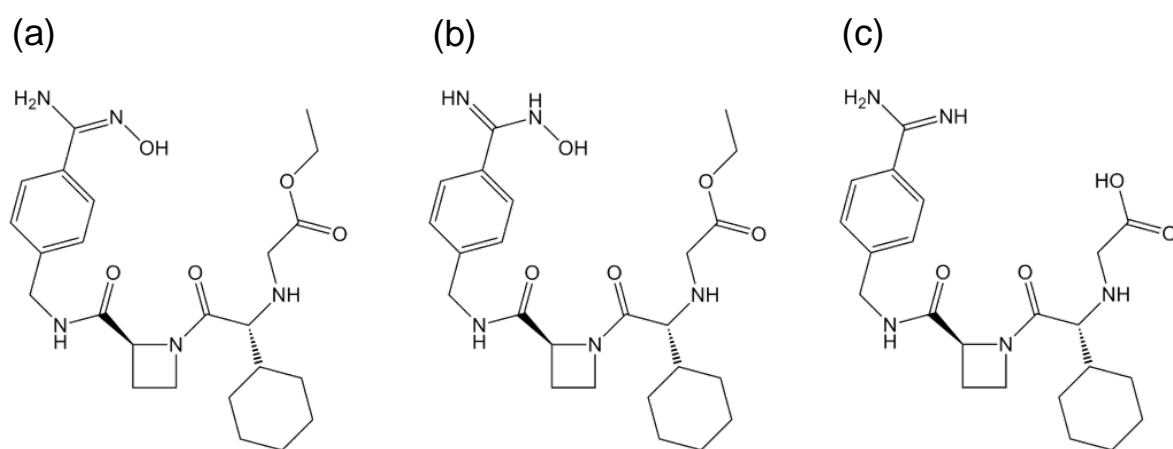


Figure 18. Chemical structures of (a) ximelagatran in oxime form, (b) ximelagatran in hydroxylamine form and (c) melagatran.

2-2. 結果

2-2-1. ドッキングシミュレーション

HLA-DRB1*07:01 ペプチド結合溝に対するキシメラガトランの結合親和性および相互作用様式を予測するため、ドッキングシミュレーションを行った。対照アレルとして HLA-DRB1*01:01 および DRB1*15:01 に対するドッキングシミュレーションも行い、ペプチド結合溝との結合親和性における DRB1*07:01 特異性を評価した。さらに、キシメラガトランを経口投与後のヒト血漿中における主代謝物であるメラガトランについても合わせて評価した。その結果、いずれの HLA-DR に対してもキシメラガトランはペプチド結合溝の広範囲と相互作用する事が示唆された (Figure 19)。HLA-DRB1*01:01、DRB1*07:01 および DRB1*15:01 に対するキシメラガトランの GBVI/WSA_dG の最小値はそれぞれ、-11.88 kcal/mol、-11.24 kcal/mol および-10.99 kcal/mol と非常に低く、キシメラガトランが非常に高い HLA-DR との相互作用ポテンシャルを有する事が示唆された (Table 8)。一方、GBVI/WSA_dG 値としては HLA-DRB1*07:01 選択性は認められなかった。また、主代謝物であるメラガトランの相互作用ポテンシャルは、いずれの HLA-DR に対してもキシメラガトランよりも低いと考えられた (Table 8)。

Table 8. The lowest GBVI/WSA_dG values of the complexes between ximelagatran or melagatran and three HLA-DR molecules.

HLA allele	Ximelagatran		Melagatran
	Tautomer	GBVI/WSA_dG (kcal/mol)	GBVI/WSA_dG (kcal/mol)
DRB1*01:01	Hydroxylamine	-11.88	-9.91
DRB1*07:01	Oxime	-11.24	-10.41
DRB1*15:01	Hydroxylamine	-10.99	-10.70

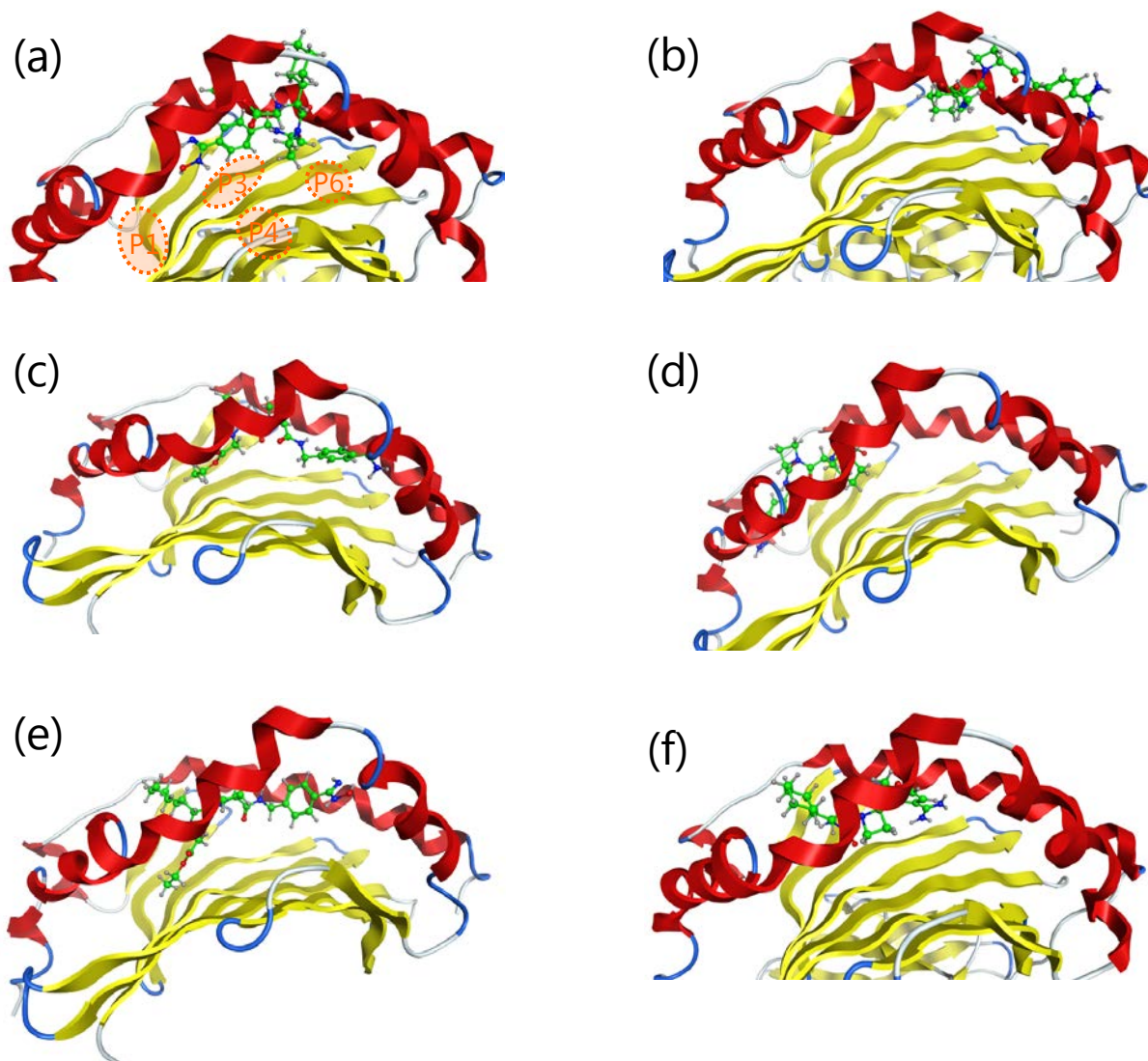


Figure 19. Binding modes of ximelagatran (a,c,e) and melagatran (b,d,f) at the peptide binding grooves of HLA-DR molecules with the lowest GBVI/WSA_dG values in each complex, (a,b) DRB1*01:01, (c,d) DRB1*07:01 and (e,f) DRB1*15:01. The structures of the HLA-DR molecules are depicted in cartoon mode (α helix in red and β sheet in yellow) and ximelagatran and melagatran are depicted in ball-and-stick model (C in green, H in gray, N in blue and O in red).

2-2-2. 分子動力学シミュレーション

③ HLA-DRB1*07:01-キシメラガトラン複合体

3 者複合体シミュレーションの開始位置として適切なキシメラガトランのコンフォメーションを選択すると共に、キシメラガトランとの相互作用による HLA-DRB1*07:01 のコンフォメーション変化を予測するため、HLA-DRB1*07:01-キシメラガトラン 2 者複合体 (TT ペプチド無し) の MD シミュレーションを行った。シミュレーション開始後速やかに系全体のエネルギー状態は安定化し (Figure 20(a))、RMSD も 1.5 ns 以内に安定化し

た (Figure 20(c)). HLA-DRB1*01:01-ネビラピン複合体 (Figure 15(d)、Table 7) とは異なり、シミュレーションを通じてペプチド結合溝サイズに大きな変化はなく、ペプチド結合溝は開いたままであった (Figure 20(d)、Table 9)。キシメラガトランはペプチド結合溝の P3 ポケットから P6 ポケットまでの広範囲に跨って寝そべる様に相互作用しており、”代表構造”としてはエチル基を P4 ポケットに突き刺す結合様式を取ったが、キシメラガトラン全体の RMSF は比較的大きく、結合はやや不安定と考えられた (Figure 21(a,b))。

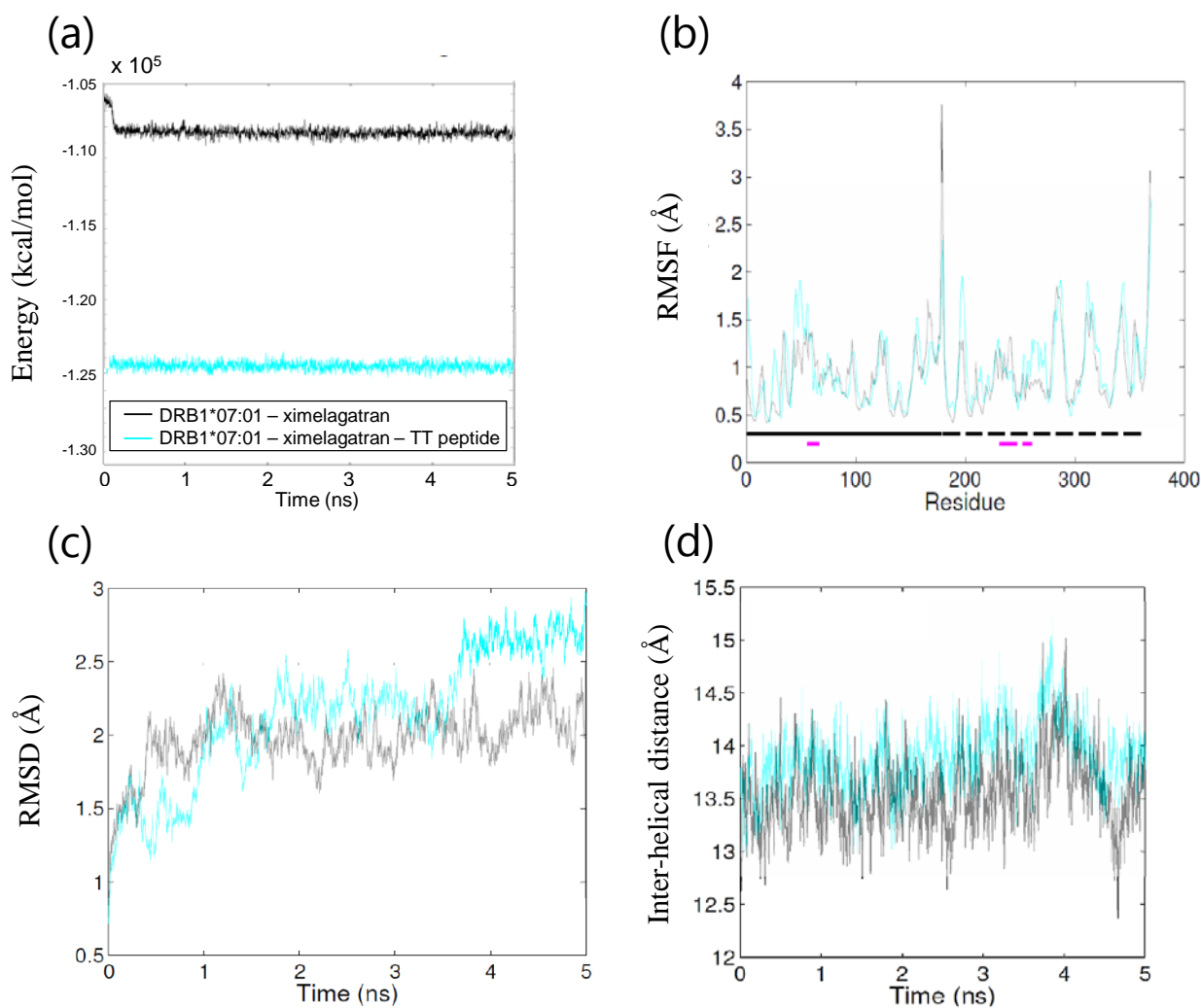


Figure 20. Parameters of MD simulations of HLA-DRB1*07:01-ximelagatran complex and HLA-DRB1*07:01-ximelagatran-TT peptide trimer. (a) Calculated energies vs. time plot, (b) RMSF values of polypeptide backbone, (c) RMSD values of polypeptide backbone vs. time plot and (d) the average inter-helical distance curves.

Table 9. Parameters of MD simulations of HLA-DRB1*07:01-ximelagatran complex and HLA-DRB1*07:01-ximelagatran-TT peptide trimer (mean \pm SD).

HLA allele	DRB1*07:01	
Ximelagatran	+	+
TT peptide frame	-	3
Energy (kcal/mol)	-108308 \pm 358	-124612 \pm 244
RMSF (\AA)	0.9 \pm 0.4	1.0 \pm 0.4
Inter-helical distance (\AA)	13.7 \pm 0.4	14.1 \pm 0.3
Slope of inter-helical distance curve ($\text{\AA}/\text{ns}$)	0.06	0.08

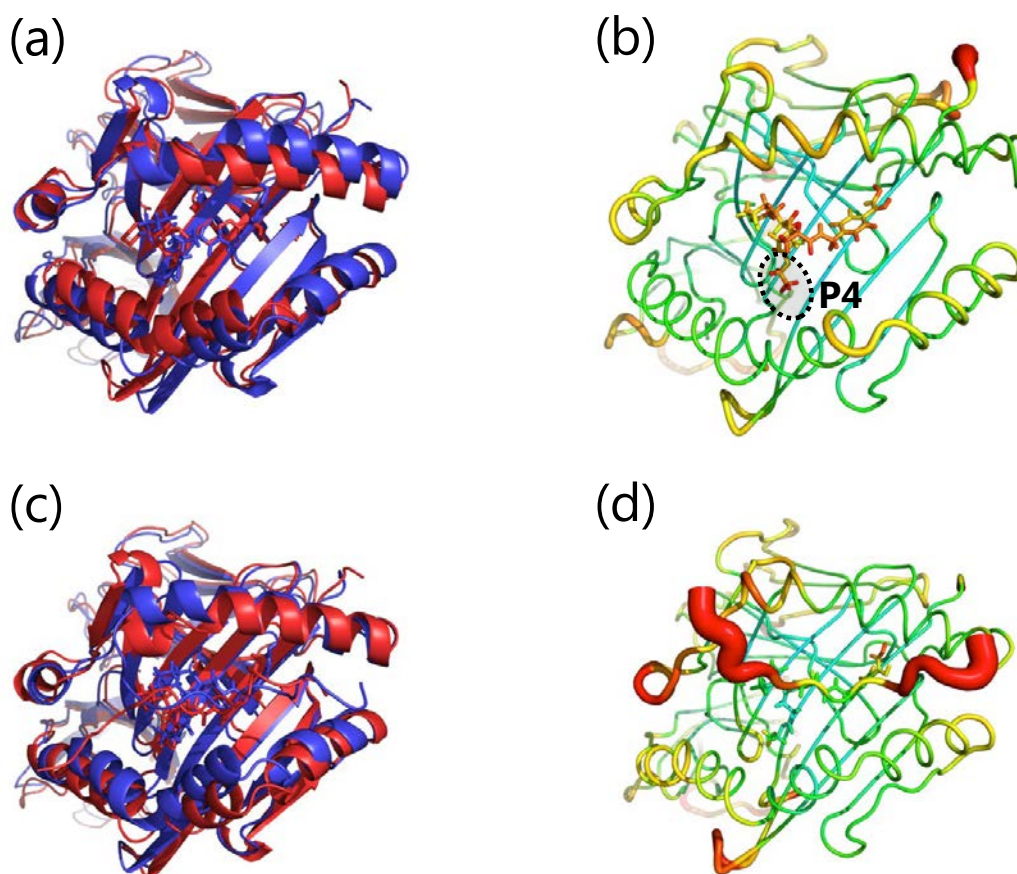


Figure 21. Simulated representative structures of (a,b) HLA-DRB1*07:01-ximelagatran complex and (c,d) HLA-DRB1*07:01-ximelagatran-TT peptide trimer in frame 3. (a,c) Alignment of the initial structure (red) and a representative structure (blue) and (b,d) sausage plot of the structure.

④ HLA-DRB1*07:01-キシメラガトラン-TT ペプチド 3 者複合体 (フレーム 3)

HLA-DRB1*07:01-TT ペプチド複合体のコンフォメーションに対するキシメラガトランの影響を評価する目的で、HLA-DRB1*07:01-キシメラガトラン-TT ペプチド 3 者複合

体の MD シミュレーションを行った。系全体のエネルギーはシミュレーションを通じて安定であった (Figure 20(a)) が、RMSD は増加傾向を示した (Figure 20(c))。キシメラガトランは TT ペプチド非存在下と同様なコンフォメーションを取り、ペプチド結合溝の P3 ポケットから P6 ポケットまでと相互作用する事が示唆された (Figure 21(c,d))。一方、TT ペプチドの両末端は RMSF が極めて大きく、“代表構造”としてはペプチド結合溝の外側に飛び出すコンフォメーションを取り、ペプチド結合溝との相互作用は極めて限定的となる事が示唆された。ペプチド結合溝サイズは HLA-DRB1*07:01-TT ペプチド複合体 ($13.0 \pm 0.3 \text{ \AA}$; Table 6) と比較して、3 者複合体で広がった (Table 9)。

2-2-3. *In vitro* ペプチド結合試験

HLA-DRB1*07:01 へのプローブペプチドの結合に対するキシメラガトランのアレル選択的な阻害作用¹⁸⁾の再現性を確認するため、*in vitro* ペプチド結合試験を実施した。その結果、プローブペプチドの HLA-DRB1*07:01 への結合がキシメラガトラン (1000 μM) によりアレル選択的に阻害され、既報データ¹⁸⁾の再現性が確認された (Table 10)。

Table 10. The effect of ximelagatran on the binding of the probe peptides to HLA-DR molecules. The effects of ximelagatran are expressed as a percentage of the binding of the probe peptides compared with DMSO control (n = 8). Values show average \pm SD of quadruplicate.

HLA allele	DRB1*01:01	DRB1*07:01	DRB1*15:01
% of DMSO control	105.7 \pm 4.4	91.1 \pm 13.4	112.3 \pm 8.4

さらに、*in silico* 評価で示唆された HLA-DRB1*07:01 ペプチド結合溝とキシメラガトランの直接相互作用を実験的に検証するため、同サンプル中の HLA-DR 分子を抗 HLA-DR 抗体で捕捉した後、アセトニトリルを用いてキシメラガトランを抽出し、LC-MS/MS による定量を行い、HLA-DR 分子に直接結合したキシメラガトランの検出を試みた。その結果、いずれの HLA アレルについても、HLA 非存在下と比較して HLA 存在下でキシメラガトラン濃度の上昇が認められた (Table 11; #1 vs #2、#4 vs #5 および #7 vs #8)。統計学的有意差 ($P < 0.05$) が認められたのは HLA-DRB1*01:01 ($P = 0.006$) のみであったが、DRB1*07:01 ($P = 0.087$) および DRB1*15:01 ($P = 0.084$) についても有意傾向を示し

た。さらに、プローブペプチド共存下においては、いずれの HLA アレルでもキシメラガトラン濃度の低下が認められたが (#2 vs #3、#5 vs #6 および #8 vs #9)、HLA-DRB1*07:01 でその低下具合が最も弱い傾向にある事が示唆された (P = 0.211)。

Table 11. Concentration of ximelagatran in the peptide binding study samples detected by LC-MS/MS. Concentration of ximelagatran in each sample is expressed as average \pm SD of quadruplicate. P-values were calculated for concentrations of ximelagatran in the absence of the ligand peptide compared with the absence of HLA-DR, and for concentrations of ximelagatran in the presence of HLA-DR and the ligand peptide compared with the presence of HLA-DR in the absence of the ligand peptide for each HLA-DR allele. (NA = not applicable).

Incubation No.	HLA allele	HLA	Probe peptide	Concentration of ximelagatran (nM)	P-value
#1		-	+	0.11 \pm 0.01	NA
#2	DRB1*01:01	+	-	0.17 \pm 0.03	0.006 (vs 1)
#3		+	+	0.13 \pm 0.01	0.023 (vs 2)
#4		-	+	0.13 \pm 0.01	NA
#5	DRB1*07:01	+	-	0.17 \pm 0.03	0.087 (vs 4)
#6		+	+	0.14 \pm 0.01	0.211 (vs 5)
#7		-	+	0.14 \pm 0.03	NA
#8	DRB1*15:01	+	-	0.23 \pm 0.09	0.084 (vs 7)
#9		+	+	0.14 \pm 0.02	0.076 (vs 8)

2-3. 考察

プロドラッグであるキシメラガトランは生体内で速やかに代謝を受けるが、吸収率は40-70%と高い事から⁸⁰⁾、肝臓は非常に高濃度のキシメラガトラン曝露を受けると推測される。したがって、ヒト血漿中の主代謝物であるメラガトランではなく、キシメラガトランが IDILI の主要因である可能性は十分考えられる。本研究のドッキングシミュレーションでは、3種類の HLA-DR 全てに対して、メラガトランよりもキシメラガトランが高い相互作用ポテンシャルを有すると予測された (Table 8)。また、キシメラガトランの GBVI/WSA_dG は同システムで予測したアバカビル、ネビラピンおよびアロプリノールの値と比較して顕著に低く^{69),75),76)}、キシメラガトランの HLA-DR 分子に対する相互作用ポテンシャルは極めて高い事が示唆された。

MD シミュレーションでは、ネビラピン (Table 7) の場合とは対照的に、キシメラガトランとの相互作用により HLA-DRB1*07:01 ペプチド結合溝は開いたコンフォメーションを維持する事が示唆された (Table 9)。本作用は、HLA-DR 分子への抗原ペプチドの結合を促進する、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) loading enhancer (MLE) として知られる AdCaPy と同様の作用である^{71),73)}。しかし、HLA-DR 分子の P1 ポケットにすっぽり嵌まり込む AdCaPy とは異なり、キシメラガトランは HLA-DRB1*07:01 の P3 ポケットから P6 ポケットまでの広範囲と相互作用しており、むしろ抗原ペプチドが結合した HLA-DR 分子のコンフォメーションに近いと考えられた。3 者複合体では、キシメラガトランがペプチド結合溝底面の広範囲を修飾する事により、TT ペプチドとペプチド結合溝ポケットとの本来の相互作用の大部分が阻害された結果、TT ペプチドの両末端は極めて不安定となり、“代表構造”としてはペプチド結合溝の外側に飛び出すコンフォメーションとなった (Figure 21(c,d))。この結果は、キシメラガトランが HLA-DRB1*07:01 への TT ペプチドの結合を阻害する可能性を示していると考えられた。また、ペプチド結合溝サイズに注目すると、HLA-DRB1*07:01-TT ペプチド複合体と比較して、3 者複合体では顕著にペプチド結合溝が広がっており (Table 6、Table 9)、この結果からも TT ペプチドと HLA-DRB1*07:01 との相互作用がキシメラガトラン存在下で弱くなっている

ると推察された。本シミュレーション結果は、*in vitro* で認められたキシメラガトランの作用と合致しており、妥当な結果と考えられる¹⁸⁾ (Table 10)。

さらに *in vitro* ペプチド結合試験において、HLA-DR 分子に結合したキシメラガトランを LC-MS/MS により定量したところ、3 種類の HLA-DR 全てに対して、キシメラガトランの結合が示唆された (Table 11)。本結果はドッキングシミュレーションで予測されたキシメラガトランの相互作用ポテンシャルの高さと合致した。一方、プローブペプチド共存下では、いずれの HLA-DR においてもキシメラガトラン濃度の低下が認められ、HLA-DR に対するキシメラガトランの結合がプローブペプチドに阻害されたと考えられた。しかし、興味深い事に、キシメラガトラン濃度低下の程度には HLA アレル間で若干の差があり、HLA-DRB1*07:01 では最も弱い傾向にある事が示唆された (Table 11)。ドッキングシミュレーションで予測した各 HLA-DR 分子に対するキシメラガトランの結合様式は全て異なる (Figure 19) 事から、HLA-DR 分子への抗原ペプチド結合に対する作用が HLA アレル間で異なる事は十分あり得ると考えられる。

以上の結果より、キシメラガトランは比較的多様な HLA-DR 分子のペプチド結合溝と直接相互作用するものの、HLA-DRB1*07:01 に対しては抗原ペプチド存在下でも比較的安定に結合する事により、抗原ペプチドの HLA-DRB1*07:01 への結合を競合阻害していると考えられた。一般的に、抗原提示の阻害を介して薬物特異的な免疫系活性化が生じるとは考えにくい。しかし、本研究により、少なくともキシメラガトランと HLA-DRB1*07:01 との直接的な相互作用が示された事から、キシメラガトランが HLA-DRB1*07:01 ペプチド結合溝底面を修飾する事で、HLA-DRB1*07:01 に提示される抗原ペプチドレパートリーが変化する可能性は十分考えられる。今後、HLA-DRB1*07:01 発現細胞を用いたペプチドレパートリーの解析が期待される。

2-4. 小括

キシメラガトランは HLA-DRB1*07:01 ペプチド結合溝の広範囲と相互作用し、抗原ペプチドの結合性を調節する事が示唆された。キシメラガトランによって HLA-DRB1*07:01 に提示される抗原ペプチドのレパートリーが変化する事で、キシメラガトラン特異的な免疫反応が惹起され、IDILI のトリガーとなる可能性が考えられる。

第3章 ラパチニブと HLA-DRB1*07:01 の相互作用

3-1. 小序

ラパチニブ (Figure 22) は上皮成長因子受容体および HER2/neu を阻害する二重チロシンキナーゼ阻害薬であり、HER2 過剰発現が確認された手術不能または再発乳癌を対象として、カペシタビンまたはアロマターゼ阻害薬との併用で用いられる。忍容性は概ね良好なもの、1.6-3.0%の患者でグレード3のALT上昇、さらに0.2%の患者で Hy's law に該当する重篤な IDILI が認められ⁸¹⁾、間質性肺炎と共に【警告】となっている。ゲノムワイド関連解析により、IDILI と HLA-DQA1*02:01 および DRB1*07:01 との間に強い遺伝的関連性が見出され、ラパチニブによる IDILI 発症における免疫系の関与が示唆された^{16),17)}。これら HLA アレル間には強い連鎖不平衡が認められるが、ヘテロダイマー解析手法により、単独で IDILI 発症との因果関係がある HLA アレルは DRB1*07:01 のみである事が示されている¹⁵⁾。しかし、IDILI 予測因子としての HLA-DRB1*07:01 は非常に高い陰性的中率を示すものの陽性的中率は低く (Table 1)、臨床での IDILI 予測バイオマーカーとしての活用は進んでいない。そこで、さらなる関連遺伝子の同定を目的として、全ゲノムシーケンスを含めた包括的な遺伝子解析が行われたが、残念ながら HLA-DRB1*07:01 以外の関連遺伝子は見出されなかった⁸²⁾。したがって、HLA-DRB1*07:01 を介したラパチニブ特異的な免疫反応が、ラパチニブによる IDILI 発症において極めて重要な反応である事は間違いないと考えられる。

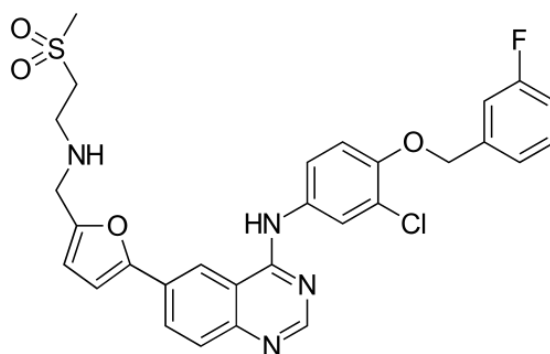


Figure 22. Chemical structure of lapatinib.

また、ラパチニブが CYP3A4/5 により反応性代謝物に変換され、生体内タンパク質への共有結合、ミトコンドリアストレス等を引き起こす事⁸³⁾、さらに CYP3A4 誘導作用を有するデキサメタゾンとの併用により、グレード 1 以上の ALT 上昇が 3.5 倍に増加する事が報告されている⁸⁴⁾。したがって、反応性代謝物を介した肝細胞への直接的なダメージによる”danger signal”と HLA-DRB1*07:01 を介した免疫系活性化が組み合わさる事で、重篤な IDILI 発症に至ると推測される。

本章では、ラパチニブと HLA-DRB1*07:01 との相互作用について各種検討を行い、アレル特異性を含めて相互作用メカニズムの解析を行った。

3-2. 結果

3-2-1. 分子動力学シミュレーション

MD シミュレーションにより HLA アレル特異的な薬物作用が評価可能か否かを検討するため、本章では 3 種類の HLA-DR (DRB1*01:01, DRB1*07:01, DRB1*15:01) 分子を対象としてシミュレーションを行った。

② HLA-ラパチニブ複合体

3 者複合体シミュレーションの開始位置として適切なラパチニブのコンフォメーションを選択すると共に、ラパチニブとの相互作用による各 HLA-DR 分子のコンフォメーション変化を予測するため、HLA-ラパチニブ 2 者複合体 (リガンドペプチド無し) の MD シミュレーションを行った。いずれの複合体もシミュレーション開始後約 0.5 ns までに系全体のエネルギー状態は安定化し (Figure 23(a))、各アミノ酸残基 α 炭素の RMSF は HLA-DRB1*01:01 と比較して DRB1*07:01 および DRB1*15:01 で大きい傾向が認められた (Figure 23(b))。RMSD の経時変化は HLA アレル毎に異なり、HLA-DRB1*01:01 ではシミュレーション開始後 0.5 ns 程度で安定化したが、HLA-DRB1*15:01 では 2.5 ns 時点まで緩やかに増加した。HLA-DRB1*07:01 は 0.5 ns 程度で安定した後、4 ns の時点で急激な RMSD の増加が認められ、その後すぐに安定化した (Figure 23(c))。ペプチド結合溝平均サイズの経時変化も HLA アレル間で異なり、HLA-DRB1*01:01 および DRB1*07:01 では、アポ体 (Table 5) よりもペプチド結合溝は狭くなった一方、DRB1*15:01 では広くなった (Figure 23(d), Table 12)。

ラパチニブは HLA-DRB1*01:01 の P1 ポケットにフルオロフェニル基を降ろし、P4 ポケットとキナゾリン環が相互作用した状態で P1 から P4 ポケットに跨って結合すると予測された (Figure 24(a,b))。メチルスルホニル基側の RMSF は比較的大きいものの、3 種類の HLA-DR との複合体の中でラパチニブ全体の RMSF は最も小さく、比較的安定な結合と見受けられた。また、HLA-DRB1*01:01-ネビラピン複合体 (Figure 16(a,b)) と比較して HLA 分子全体の RMSF は大きいものの、両鎖の α ヘリックス構造は維持された。

HLA-DRB1*07:01 に対して、ラパチニブは P1 から P6 ポケットまでの広範囲に跨って

寝そべる様に相互作用しており、結合ポケットと相互作用する両末端の RMSF はやや大きいものの、中央のキナゾリン環は安定に結合していると見受けられた (Figure 24(c,d))。キシメラガトラン (Figure 21(a,b)) との比較では、ラパチニブの方が HLA-DRB1*07:01 に対して安定に結合する可能性が高いと考えられた。興味深い事に、HLA-DRB1*07:01 の β 鎖 α ヘリックスが大きくコンフォメーション変化し、ラパチニブを包み込む様に閉じたペプチド結合溝を形成する事が示唆された。

HLA-DRB1*01:01 と同様に DRB1*15:01 に対しても、ラパチニブは P1 ポケットおよび P4 ポケットと相互作用しており、さらにメチルスルホニル基を P6 ポケットの上まで伸ばすようにして結合すると予測された (Figure 24(e,f))。しかし、HLA 分子全体の RMSF は 3 種類の HLA-DR で最も大きく、不安定な結合となる可能性が示唆された。

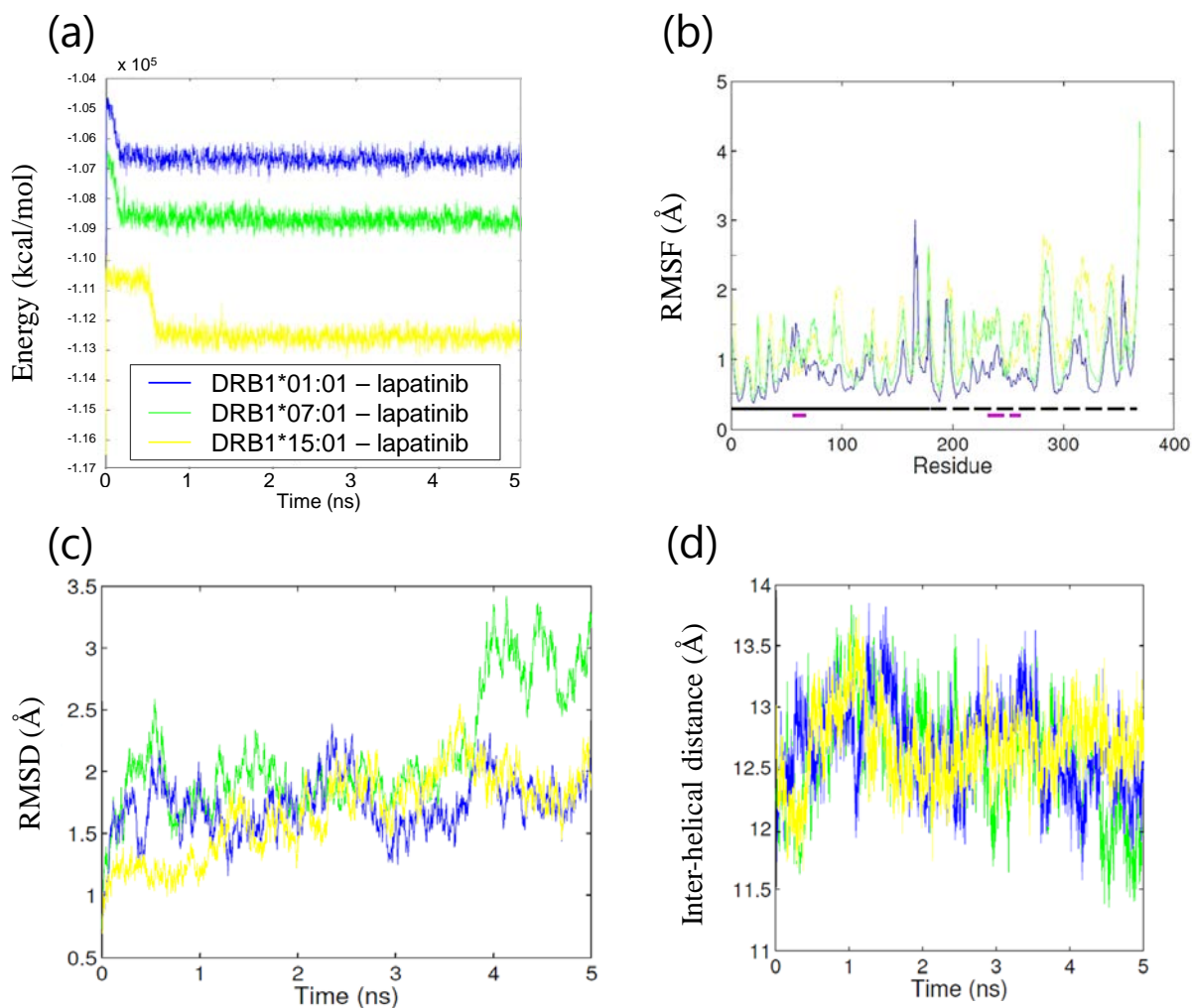


Figure 23. Parameters of MD simulations of HLA-lapatinib complexes. (a) Calculated energies vs. time plot, (b) RMSF values of polypeptide backbone, (c) RMSD values of polypeptide backbone vs. time plot and (d) the average inter-helical distance curves.

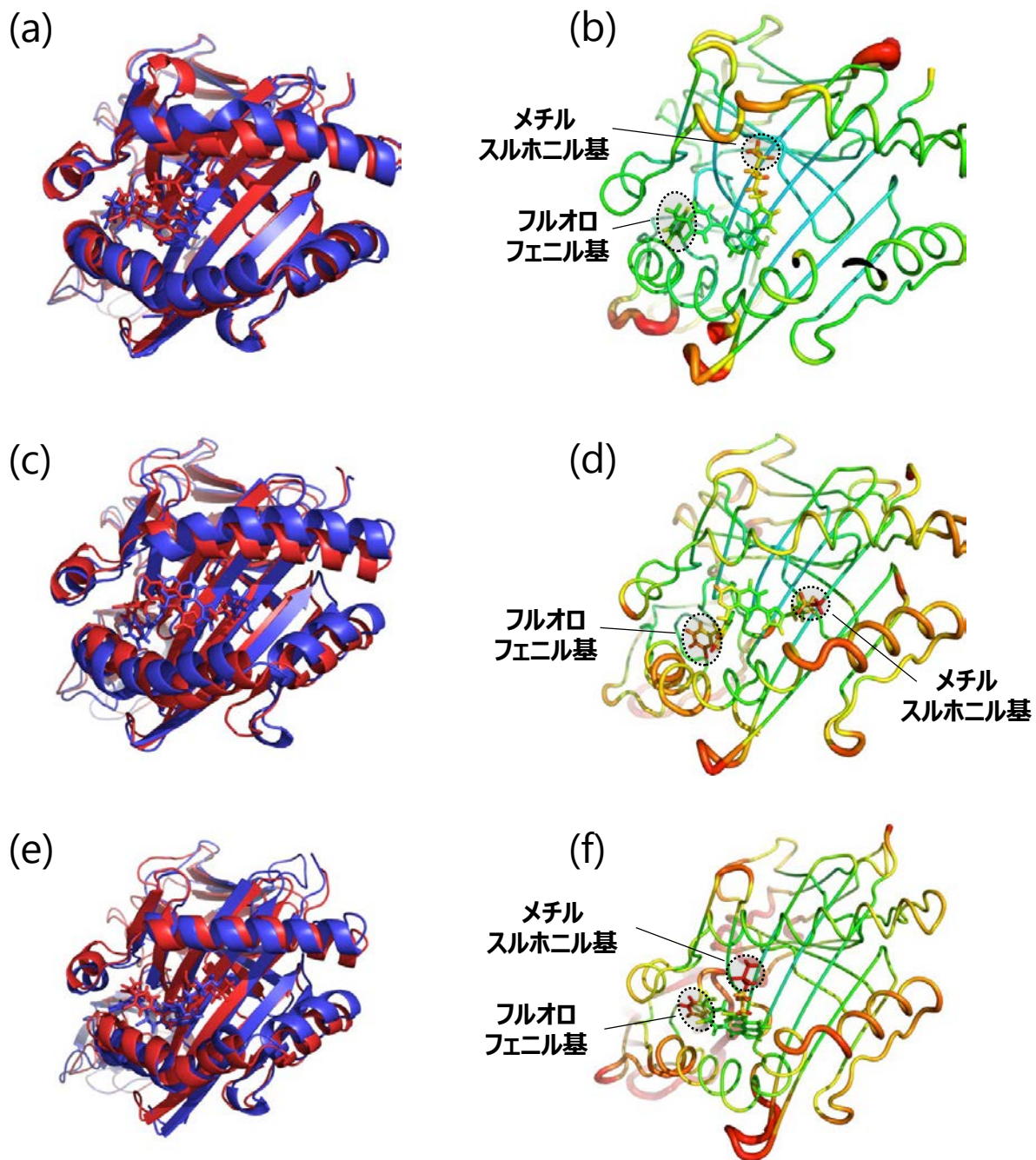


Figure 24. Simulated representative structures of lapatinib-bound (a,b) HLA-DRB1*01:01, (c,d) HLA-DRB1*07:01 and (e,f) HLA-DRB1*15:01. (a,c,e) Alignment of the initial structure (red) and a representative structure (blue) and (b,d,f) sausage plot of the structure.

Table 12. Parameters of MD simulations of HLA-lapatinib complexes (mean \pm SD).

HLA allele	Energy (kcal/mol)	RMSF (\AA)	Inter-helical distance (\AA)	Slope of inter-helical distance curve ($\text{\AA}/\text{ns}$)
DRB1*01:01	-106639 \pm 328	0.9 \pm 0.4	12.6 \pm 0.4	-0.07
DRB1*07:01	-108643 \pm 360	1.3 \pm 0.4	12.4 \pm 0.4	-0.10
DRB1*15:01	-112332 \pm 647	1.3 \pm 0.5	12.7 \pm 0.2	0.02

Table 13. Parameters of MD simulations of HLA-lapatinib-ligand peptide trimers (mean \pm SD).

HLA allele	Ligand peptide	Peptide frame	Energy (kcal/mol)	RMSF (\AA)	Inter-helical distance (\AA)	Slope of inter-helical distance curve ($\text{\AA}/\text{ns}$)
DRB1*01:01	HA	2	-120916 \pm 246	0.8 \pm 0.4	14.1 \pm 0.2	0.00
		3	-117928 \pm 224	0.9 \pm 0.4	13.7 \pm 0.2	0.06
DRB1*07:01	TT	3	-122756 \pm 293	1.1 \pm 0.6	11.4 \pm 0.3	0.02
DRB1*15:01	MBP	3	-124540 \pm 229	0.9 \pm 0.5	15.1 \pm 0.3	0.10

③ HLA-ラパチニブ-リガンドペプチド 3 者複合体

各 HLA-リガンドペプチド複合体のコンフォメーションに対するラパチニブの影響を評価する目的で、HLA-ラパチニブ-リガンドペプチド 3 者複合体の MD シミュレーションを行った。いずれの複合体も系全体のエネルギーはシミュレーションを通じて安定で、各アミノ酸残基 α 炭素の RMSF は複合体間で大差なく、各 HLA-DR のアポ体およびリガンドペプチド複合体とほぼ同等であった (Figure 25(a,b), Table 13)。RMSD は HLA-DRB1*15:01 複合体では経時的に増加したが、それ以外は 2 ns 以内には安定化した (Figure 25(c))。ペプチド結合溝平均サイズは HLA-DRB1*07:01 複合体の狭さが際立ったが、経時変化としてはどの複合体でも小さかった (Figure 25(d))。

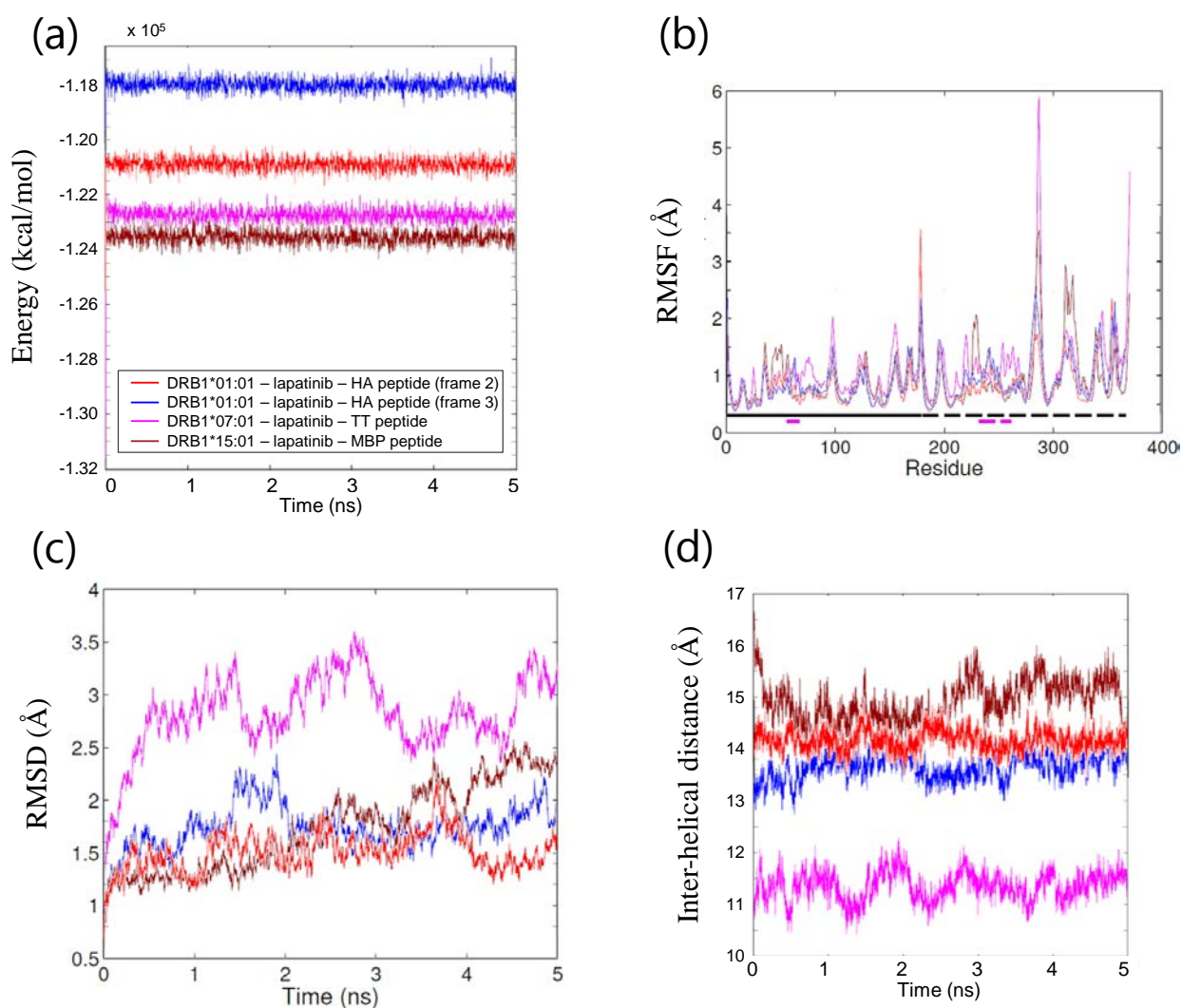


Figure 25. Parameters of MD simulations of HLA-lapatinib-ligand peptide trimers. (a) Calculated energies vs. time plot, (b) RMSF values of polypeptide backbone, (c) RMSD values of polypeptide backbone vs. time plot and (d) the average inter-helical distance curves.

HLA-DRB1*01:01-HA ペプチド (フレーム 2) との複合体では、ラパチニブのコンフォメーションは HA ペプチド非存在下と類似しており、P1 ポケットおよび P4 ポケットとの相互作用が認められた (Figure 26(a,b))。HA ペプチドは両末端を除いて比較的 RMSF は小さく安定と考えられたが、HLA の α 鎖 α ヘリックス構造に破綻が認められたことから、複合体として妥当な構造では無い可能性が考えられた。

HLA-DRB1*01:01-HA ペプチド (フレーム 3) との複合体では、フルオロフェニル基が P1 ポケットから飛び出しており、P1 ポケットとの相互作用に関してラパチニブと HA ペプチドが競合していると考えられた (Figure 26(c,d))。HA ペプチド全体の RMSF が極めて大きく不安定と考えられたが、フレーム 2 と同様に HLA の α 鎖 α ヘリックス構造に破綻が認められたことから、複合体として妥当な構造では無い可能性が考えられた。

HLA-DRB1*07:01-TT ペプチドとの複合体では、ラパチニブは TT ペプチド非存在下と同様に、P1 ポケットから P6 ポケットまでの広範囲の底面に寝そべる様に相互作用しており、TT ペプチドとペプチド結合溝との間の本来の相互作用の大部分が阻害される可能性が示唆された (Figure 26(e,f))。また、「代表構造」における TT ペプチドは、ラパチニブの上で折れ曲がった不自然なコンフォメーションを取った。しかし同時に、 β 鎖 α ヘリックスがラパチニブおよび TT ペプチド中央部を挟み込む様に α 鎖側に大きく近づき、「堅く閉じた」非常に狭いペプチド結合溝が形成される事が示唆され (Table 13)、TT ペプチドの HLA-DRB1*07:01 への結合が安定化される可能性が考えられた。大きなコンフォメーション変化にもかかわらず、 α 鎖 α ヘリックス構造は維持された。

HLA-DRB1*15:01-MBP ペプチドとの複合体では、MBP ペプチド非存在下と同様に、ラパチニブと P1 ポケットおよび P4 ポケットとの相互作用が予測された。一方、MBP ペプチドは、ラパチニブに重なる部分を除く大部分がペプチド結合溝から飛び出しており、MBP ペプチドの結合が阻害される可能性が示唆された (Figure 26(g,h))。

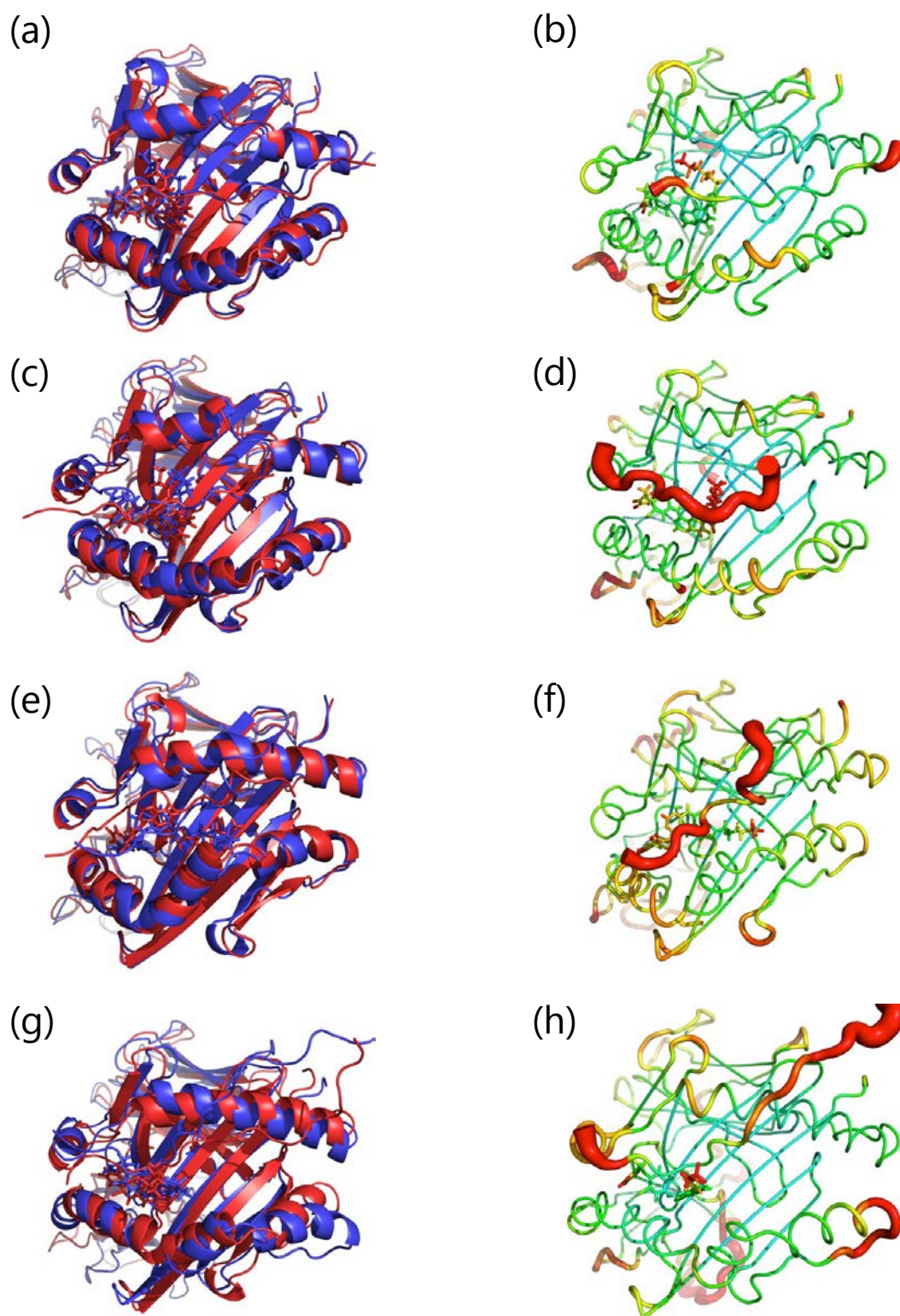


Figure 26. Simulated representative structures of lapatinib-bound trimers. (a,b) HLA-DRB1*01:01-HA peptide in frame 2 and (c,d) frame 3, HLA-DRB1*07:01-TT peptide in frame 3 and (e,f) HLA-DRB1*15:01-MBP peptide in frame 3. (a,c,e,g) Alignment of the initial structure (red) and a representative structure (blue) and (b,d,f,h) sausage plot of the structure.

合計 31 の MD シミュレーションの”代表構造”は、 β 鎖 α ヘリックスのコンフォメーションに基づき 3 つのカテゴリーに分類された (Figure 27)。アポ体および一部の HLA-薬物複合体は灰色で示す「閉じた」ペプチド結合溝を、その他大半の複合体は赤色で示す「開いた」ペプチド結合溝を形成する事が示唆された。一方、青色で示す「堅く閉じた」ペプチド結合溝は、31 のシミュレーションの中で、HLA-DRB1*07:01-ラパチニブ複合体および HLA-DRB1*07:01-ラパチニブ-TT ペプチド 3 者複合体のみで認められた。

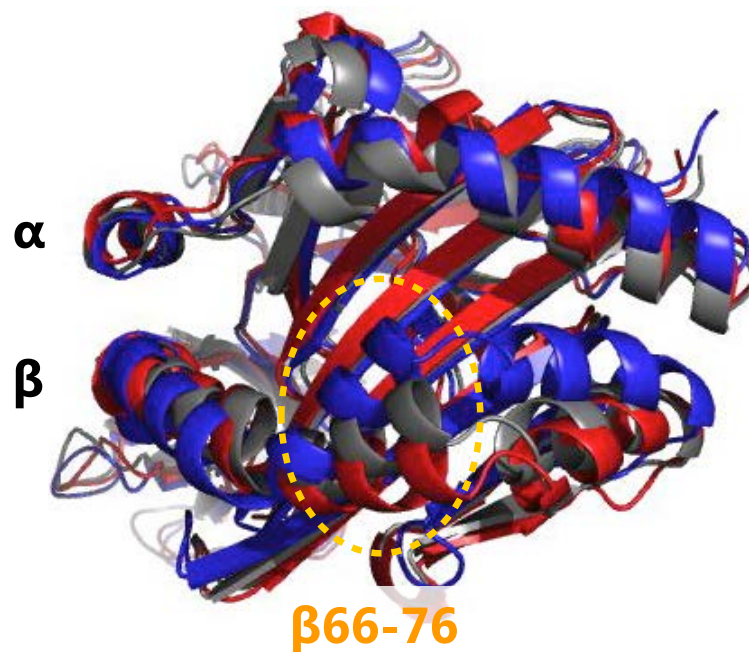


Figure 27. General conformations of HLA-DR molecules in 31 MD simulations. All representative structures from 31 MD simulations were aligned and divided into three categories based on the conformation of β -chain α -helix. A closed structure (gray), an open structure (red), and a “tightly closed” structure (blue).

3-2-2. *In vitro* ペプチド結合試験

HLA-DRB1*07:01 へのプローブペプチド結合に対するラパチニブの影響を実験的に評価するため、*in vitro* ペプチド結合試験を行った。その結果、ラパチニブは HLA-DRB1*07:01 へのプローブペプチドの結合を有意に増加させ (Figure 28(a))、その作用は 0.25 μ M から 250 μ M まで濃度依存的であった。一方、対照アレルとして評価した HLA-DRB1*15:01 へのプローブペプチドの結合に対する影響は 250 μ M で有意差が認められたものの (Figure 28(b))、HLA-DRB1*07:01 に対する 0.25 μ M の作用より弱く、HLA-DRB1*07:01 選択性が認められた。また、対照薬として用いたルミラコキシブおよびアモキシシリンでは、いずれのアレルに対しても濃度依存的な作用は認められなかった。

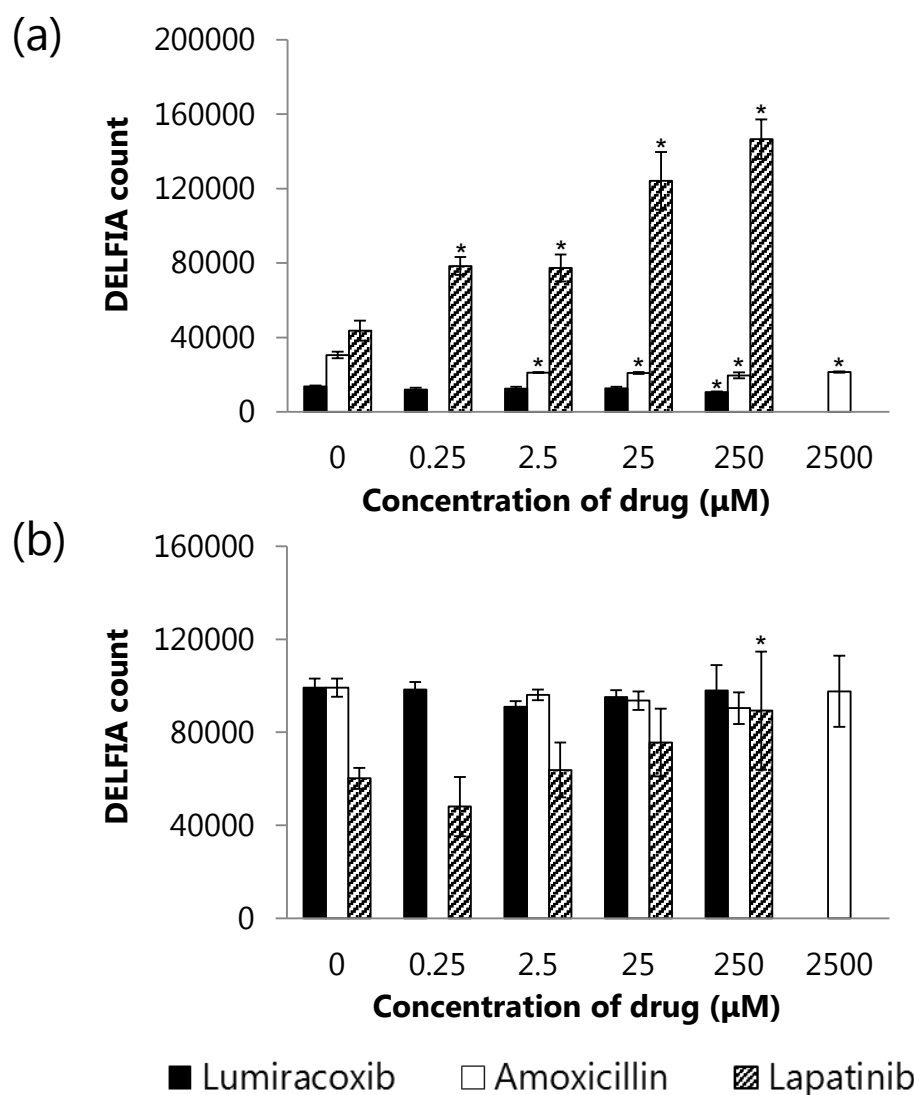


Figure 28. The effect of lapatinib, amoxicillin and lumiracoxib on the binding of probe peptides to (a) HLA-DRB1*07:01 and (b) HLA-DRB1*15:01. Data represent the mean \pm SD of triplicate.

*P < 0.05, compared with the DMSO control.

3-3. 考察

ラパチニブとキシメラガトランの IDILI 関連遺伝子として、HLA-DRB1*07:01 が共通して見出されている^{15),18)}。したがって、いずれの薬物も HLA-DRB1*07:01 を介した薬物特異的な免疫反応がトリガーとなって IDILI 発症に至ると推察される。第 2 章では、キシメラガトランが HLA-DRB1*07:01 のペプチド結合溝と直接相互作用する事により、TT ペプチドの HLA-DRB1*07:01 への結合が阻害され得る事が *in vitro* および *in silico* で示された。一方、本章の *in vitro* ペプチド結合試験では、同じペプチドの HLA-DRB1*07:01 への結合がラパチニブによってアレル選択的に促進された (Figure 28)。すなわち、両薬物が全く正反対の作用を示しており、特定の HLA アレルに対して様々な化合物が様々な相互作用様式を取る事により、異なる免疫応答を誘導する可能性を示唆していると考えられる。

本章の MD シミュレーションでは、*in vitro* で示されたラパチニブの HLA-DRB1*07:01 選択性が MD シミュレーションで説明出来るか否かを判断するため、3 種類の HLA-DR 分子を対象として検討を行った。まず、ラパチニブのペプチド結合溝との相互作用様式は HLA アレル毎に異なる事から、ペプチド結合溝を構成するアミノ酸配列に基づいた相互作用様式がシミュレーション出来ていると考えられた (Figure 24)。また、3 種類の HLA-DR に共通して、フルオロフェニル基と P1 ポケットとの相互作用が予測された。HLA-DR 分子の P1 ポケットは、MLE として知られるアダマンタン誘導體や短鎖ペプチドの結合部位であり、MLE は P1 ポケットへの結合を介して、ペプチド非受容型の閉じたペプチド結合溝構造への移行を阻害し、開いたペプチド受容型コンフォメーションを安定化させると考えられている⁷¹⁾⁻⁷³⁾。ラパチニブは HLA-DRB1*07:01 への TT ペプチドの結合を促進した事から、MLE と同様なメカニズムの可能性が考えられたが、HLA-DRB1*07:01-ラパチニブ複合体のペプチド結合溝はむしろアポ体よりもさらに狭くなると予測された事から、ラパチニブのペプチド結合促進作用は MLE とは異なるメカニズムに基づくと推測された。

3 者複合体のシミュレーションでもラパチニブの結合様式は大きくは変わらず、ペプ

チド結合溝の広範囲と相互作用すると予測された。それに伴い、リガンドペプチドとペプチド結合ポケットとの本来の相互作用は阻害され、いずれのリガンドペプチドも末端がペプチド結合溝の外側に飛び出す不自然なコンフォメーションを取る結果となった。さらに、HLA-DRB1*01:01 では HLA の α 鎖 α ヘリックス構造に破綻が認められ、シミュレーションで得られた複合体構造は妥当性に欠ける可能性が考えられた。一方、HLA-DRB1*07:01 および DRB1*15:01 の複合体では α ヘリックス構造は維持された。

HLA-DRB1*07:01 に対する TT ペプチドの結合様式も不自然なコンフォメーションとなったが、ラパチニブに重なる中央部の RMSF は比較的小さかった。これは、 β 鎖 66 番目のアミノ酸残基周辺部分が大きく α 鎖側に近づくコンフォメーション変化を起こす事で「堅く閉じた」ペプチド結合溝が形成され (Figure 26、Table 13)、ラパチニブと TT ペプチド中央部が包み込まれる様な形となり、結合が安定化されたためと推測された。この「堅く閉じた」ペプチド結合溝のコンフォメーションは、HLA-DRB1*01:01 および DRB1*15:01 とラパチニブの複合体で認められなかっただけでなく、合計 31 の MD シミュレーションの中で HLA-DRB1*07:01-ラパチニブ複合体および HLA-DRB1*07:01-ラパチニブ-TT ペプチド 3 者複合体のみで認められた事から、非常に特異性の高いコンフォメーションと考えられた (Figure 27)。すなわち、*in vitro* で認められたラパチニブの HLA-DRB1*07:01 選択性を支持する MD シミュレーション結果が得られたと考える。

以上の結果より、ラパチニブは HLA-DR ペプチド結合溝の広範囲と相互作用して抗原ペプチドの結合様式に影響を及ぼすと共に、HLA-DRB1*07:01 特異的なペプチド結合溝コンフォメーションの誘導を介して、抗原ペプチドの結合を安定化する事が示唆された。したがって、ラパチニブによって自己ペプチドが通常とは異なる結合様式で安定的に抗原提示され、T 細胞に非自己と認識される事が、免疫系活性化のトリガーとなると推測された。

3-4. 小括

ラパチニブが HLA-DRB1*07:01 ペプチド結合溝と直接相互作用する事により、抗原ペプチドの HLA-DRB1*07:01 への結合様式が変化し、さらに特異的な「堅く閉じた」ペプチド結合溝を誘導して抗原ペプチドの結合を安定化させる事が示唆された。したがって、自己ペプチドが通常とは異なる結合様式で安定的に抗原提示され、T 細胞にネオ抗原として認識される”altered conformation”メカニズムが、ラパチニブによる IDILI 発症のトリガーとなっていると推測された。

第4章 新規 IDT リスク評価系としての可能性

4-1. 小序

2000年代前半までは、一般的に、低分子化合物はそれ自身では免疫原性を持たないと考えられており、低分子薬物による HLA 分子を介した免疫系活性化メカニズムとしては、ハプテン/プロハプテン仮説が主流であった (Figure 2(1))。しかし近年では、低分子化合物と HLA あるいは TCR 分子との非共有結合的な直接相互作用を示す報告が増えており⁴⁴⁾⁻⁵²⁾、自己免疫疾患における自己抗原の提示を低分子化合物で阻害する試み⁸⁵⁾⁻⁸⁸⁾や、ペプチドワクチンのアジュバントとしての低分子 MLE の活用が提唱されている^{71),72),89)}。したがって、低分子化合物が HLA 分子と直接相互作用するコンセプト自体は合理性があると考えられる。しかし、これまでの研究で主に用いられた評価系としては、ある特定の HLA アレルに絞った細胞系の評価系が多く、創薬過程における IDT スクリーニング評価系としては、スループットおよび HLA アレルの網羅性の 2 点から現実的な活用が困難であった。

本研究の第 1 章から第 3 章では、この 2 点を考慮した 3 種類の評価方法を用いて、3 種類の IDILI 発症薬物と HLA リスクアレルとの相互作用メカニズムの検討を行った。本章では、第 1 章から第 3 章で得られた結果に基づき、3 種類の評価系の新規 IDT リスク評価系としての活用の可能性について考察する。

4-2. 考察

4-2-1. ドッキングシミュレーション

In silico では HLA modeler⁵⁴⁾を用いたホモロジーモデリングにより、アミノ酸配列情報のみからペプチド結合溝の立体構造を高精度で構築可能である⁵⁴⁾。したがって、理論的には、全ての HLA クラス I およびクラス II タンパク質の評価が可能であり、この HLA アレルの網羅性が *in silico* 評価系の最大の利点と考える。また、ドッキングシミュレーションは他の評価系と比較して圧倒的にスループットに優れ、スクリーニング評価に適していると考えられる。

第 1 章で予測されたネビラピンと HLA-DRB1*01:01 の P4 ポケットとの相互作用は、高リスク HLA-DR に共通するポケットモチーフ情報⁷⁴⁾と合致したことから、ドッキングシミュレーションによる薬物相互作用部位の予測は可能と期待される。また、第 2 章ではキシメラガトランと代謝物メラガトランとの間で GBVI/WSA_dG の値に差が認められたことから、HLA との相互作用ポテンシャルについて類縁化合物間での比較が可能と考えられる。したがって、HLA との相互作用ポテンシャルを低減させた誘導体獲得のための化合物磨きの指標として、ドッキングシミュレーションは有効であると期待される。一例として、Naisbitt らは、ドッキングシミュレーションで求めた HLA-B*57:01 の F ポケットに対する結合親和性 (GoldScore) を指標の一つとして誘導体展開を行い、*in vitro* において HLA-B*57:01 を介した T 細胞活性化を起こさないアバカビル誘導体の獲得に成功している⁹⁰⁾。

一方、第 1 章で予測されたネビラピンと HLA-DRB1*01:01 との間の GBVI/WSA_dG はネビラピンと HLA-B*14:02 の値より高く、結合親和性としては比較的低いと予測された。また第 2 章では、キシメラガトランと 3 種類の HLA-DR とのドッキングシミュレーションにおいて、IDILI リスクアレルである HLA-DRB1*07:01 に特異的な結合親和性の高さは見出されなかった。したがって、ドッキングシミュレーションにおける GBVI/WSA_dG の値のみから相互作用リスクの高い HLA アレルを見出す事は困難と考えられた。加えて、ドッキングシミュレーションではあくまで HLA 分子と薬物の直接

相互作用を評価する系であり、HLA 分子あるいは抗原ペプチドのコンフォメーション変化は評価出来ないため、“altered self-repertoire”モデルや“altered conformation”仮説の様な免疫系活性化メカニズムの考察を行う事は困難である。

以上より、ドッキングシミュレーションは、アレル特異性予測およびコンフォメーション変化の評価には適さないものの、圧倒的に優れたスループットと HLA アレルの網羅性から、創薬早期を中心とした一次スクリーニング評価としての有用性が期待される。

4-2-2. 分子動力学シミュレーション

理論的には、MD シミュレーションでも全ての HLA アレルについて評価を行う事は可能である。しかし、ドッキングシミュレーションと比較して MD シミュレーションではスループットが大きく低下するため、高スループットを要する一次スクリーニング評価には適さないと考えられる。

第 1 章では、ネビラピンが HLA-DRB1*01:01 の P4 ポケットと相互作用する事により、HA ペプチドならびに HLA 分子のコンフォメーションが変化する事が示唆され、“altered conformation”仮説を支持する結果を得た。第 2 章では、キシメラガトランが HLA-DRB1*07:01 への TT ペプチドの結合を不安定化させる事が示唆され、*in vitro* における作用と合致した。第 3 章では、ラパチニブによりリガンドペプチドの HLA-DR への結合様式が大きく変化すると共に、HLA-DRB1*07:01 特異的なペプチド結合溝のコンフォメーション変化が誘導される事が示唆され、抗原ペプチド結合の安定化を介した“altered conformation”仮説を支持する結果を得た。いずれの薬物についても、MD シミュレーションにより、リガンドペプチドおよび HLA 分子のコンフォメーション変化、すなわち抗原提示の修飾が示唆された。したがって、ドッキングシミュレーションでは評価困難な、抗原ペプチドおよび HLA 分子のコンフォメーションに対する薬物の影響が評価可能である点が、MD シミュレーションの利点と考えられる。加えて、第 3 章ではラパチニブによる HLA-DRB1*07:01 アレル特異的なコンフォメーション変化が認められ、*in vitro* におけるアレル特異性を説明し得る結果が得られた。したがって、ドッキングシミュレーションでは困難なアレル特異性に注目した評価が期待される。

一方で、抗原ペプチドのコンフォメーション変化が免疫系活性化に重要な薬物の場合、シミュレーション結果が用いるリガンドペプチドに依存する可能性が考えられ、リガンドペプチドの選択には注意が必要である。

以上より、MDシミュレーションは一次スクリーニング評価には適さないが、ドッキングシミュレーションよりも高次の評価系として、アレル特異性およびコンフォメーション変化に注目した、抗原提示に対する薬物の影響の評価および考察に非常に有用と考えられる。

4-2-3. *In vitro* ペプチド結合試験

2018年9月の時点で、HLAクラスIおよびクラスIIアレルはそれぞれ14,800種類および5,288種類存在する⁹¹⁾。これら全てのHLAアレルのタンパク質を準備する事は現実的に極めて困難であり、*in vitro* 評価系では評価可能なHLAアレル数が限られてしまう事態は避けられない。

本試験系は比較的単純なELISA評価系であり、本研究では96 wellフォーマットを用いたが、384 wellプレートを用いて更なる高スループット化が可能である⁹²⁾。したがって、特定のHLAアレルに絞った上でのスクリーニング評価としての活用は十分可能である。例えば、IDTが認められた先行品のバックアップ化合物取得のためのスクリーニング評価、あるいは開発予定地域の民族集団におけるメジャーアレルに絞ったスクリーニング評価等での活用が考えられる。

また、本研究で評価した3種類の薬物全てにおいて、IDILIリスクアレルに特異的なプローブペプチド結合量の変化が認められた。したがって、HLAアレル特異性も含めた免疫系活性化リスク評価が可能と期待される。

さらに第2章では、LC-MS/MSを用いてサンプル中のキシメラガトランの検出を試み、HLA分子との直接結合を示唆する結果を得た。HLA分子と薬物の直接相互作用を簡便かつ直接的に評価出来る点で極めて有用である。ただし、HLA濃度設定、MS感度および非特異的吸着等の試験条件について改善が必要であり、今後の検討課題である。

加えて、本試験系はHLA分子に対するプローブペプチド結合量の変化を検出する評

価系であるため、MD シミュレーションと同様に、用いるプローブペプチドによって結果が変わり得る点に留意が必要である。理想的には、一部の自己免疫疾患の様に、免疫系活性化の原因となる自己抗原が同定されている事が望ましいが、IDT の原因として明確に同定された自己抗原はこれまでに存在しない。またこの点は、プローブペプチドを用いる限り、細胞系であっても払拭出来ない課題である⁹³⁾。したがって、本評価系の課題を十分に理解した上で評価および判断を行う事が極めて重要である。

以上より、*in vitro* ペプチド結合試験は、*in silico* 評価系で示唆された薬物の IDT リスクについて、より詳細に評価するための高次評価系、あるいは特定の HLA アレルおよび特定の抗原ペプチドを対象を絞った上でのスクリーニング評価系として、極めて有用である。ただし、プローブペプチドの選択については今後の検討および改善の余地があると考ええる。

また、いずれの評価系にも共通の課題であるが、HLA 分子との相互作用ポテンシャル、抗原ペプチドあるいは HLA 分子のコンフォメーション変化、HLA 分子へのプローブペプチド結合量の変化といった結果が、免疫系活性化に繋がる事を直接的に示す証左は、現状不十分である。したがって、HLA 分子を介した免疫系活性化が *in vivo* および細胞系で確認された薬物について、同様な評価を継続して行う事で証左を積み重ね、IDT リスク評価系としての妥当性を強化していく事が、今後重要と考える。

4-3. 小括

本研究で用いた3種類の評価系はそれぞれ異なる特徴を有しており、組み合わせて用いる事により、アレル特異性まで含めた HLA 分子との相互作用メカニズムの考察が可能であった。

いずれも免疫系活性化を直接予測出来る評価系ではないものの、それぞれの特色と課題を理解して総合的に用いる事により、HLA 分子との相互作用を介した IDT リスクの低い新規薬物取得のためのスクリーニング評価系として活用する意義は大いにあると考えられる。

総括

本研究では、3種類の IDILI 発症薬物と、IDILI 発症関連因子である HLA クラス II 分子との相互作用について *in silico* および *in vitro* の検討を行い、いずれの薬物も HLA ペプチド結合溝との直接相互作用により、抗原ペプチドおよび HLA 分子のコンフォメーションに影響を及ぼす事が示唆された。

本研究で用いた *in silico* および *in vitro* 評価法は HLA アレル特異性も含めた IDILI リスクの評価が可能であり、更に評価アレルを拡大する事で、肝障害以外も含めた IDT リスクの新規評価系として、新薬開発の成功確率向上に貢献する事が期待される。

参考文献

- 1) Reuben A., Koch D. G., Lee W. M., Acute Liver Failure Study Group, *Hepatology*, **52(6)**, 2065-2076 (2010).
- 2) Watkins P. B., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **89(6)**, 788-790 (2011).
- 3) Tujios S. R., Lee W. M., *Liver Int.*, **38(1)**, 6-14 (2018).
- 4) Sgro C., Clinard F., Ouazir K., Chanay H., Allard C., Guilleminet C., Lenoir C., Lemoine A., Hillon P., *Hepatology*, **36(2)**, 451-455 (2002).
- 5) Takikawa H., *Nihon Naika Gakkai Zasshi*, **104(5)**, 991-799 (2015).
- 6) Uetrecht J., Naisbitt D. J., *Pharmacol. Rev.*, **65(2)**, 779-808 (2013).
- 7) Bedard K., Smith S., Cribb A., *Br. J. Dermatol.*, **142(2)**, 253-258 (2000).
- 8) Aithal G. P., Ramsay L., Daly A. K., Sonchit N., Leathart J. B., Alexander G., Kenna J. G., Caldwell J., Day C. P., *Hepatology*, **39(5)**, 1430-1440 (2004).
- 9) Naisbitt D. J., Britschgi M., Wong G., Farrell J., Depta J. P., Chadwick D.W., Pichler W. J., Pirmohamed M., Park B. K., *Mol. Pharmacol.*, **63(3)**, 732-741 (2003).
- 10) Castrejon J. L., Berry N., El-Ghaiesh S., Gerber B., Pichler W. J., Park B. K., Naisbitt D. J., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **125(2)**, 411-418.e4 (2010).
- 11) Kaniwa N., Saito Y., *J. Hum. Genet.*, **58(6)**, 317-326 (2013).
- 12) Illing P. T., Purcell A. W., McCluskey J., *Immunogenetics*, **69(8-9)**, 617-630 (2017).
- 13) Sullivan A., Watkinson J., Waddington J., Park B. K., Naisbitt D. J., *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **14(3)**, 261-274 (2018).
- 14) Alfirevic A., Pirmohamed M., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **92(3)**, 376-80 (2012).
- 15) Schaid D. J., Spraggs C. F., McDonnell S. K., Parham L. R., Cox C. J., Ejlersen B., Finkelstein D. M., Rappold E., Curran J., Cardon L. R., Goss P. E., *J. Clin. Oncol.*, **32(22)**, 2296-2303 (2014).
- 16) Spraggs C. F., Budde L. R., Briley L. P., Bing N., Cox C. J., King K. S., Whittaker J. C., Mooser V. E., Preston A. J., Stein S. H., Cardon L. R., *J. Clin. Oncol.*, **29(6)**, 667-673

(2011).

- 17) Spraggs C. F., Parham L. R., Hunt C. M., Dollery C. T., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **91(4)**, 647-652 (2012).
- 18) Kindmark A., Jawaid A., Harbron C. G., Barratt B. J., Bengtsson O. F., Andersson T. B., Carlsson S, Cederbrant K. E., Gibson N. J., Armstrong M., Lagerström-Fermér M. E., Dellsén A., Brown E. M., Thornton M., Dukes C., Jenkins S. C., Firth M. A., Harrod G. O., Pinel T. H., Billing-Clason S. M., Cardon L. R., March R. E., *Pharmacogenomics J.*, **8(3)**, 186-195 (2008).
- 19) Singer J. B., Lewitzky S., Leroy E., Yang F., Zhao X., Klickstein L., Wright T. M., Meyer J., Paulding C.A., *Nat. Genet.*, **42(8)**, 711-714 (2010).
- 20) Carr D. F., Chaponda M., Jorgensen A. L., Castro E. C., van Oosterhout J. J., Khoo S. H., Laloo D. G., Heyderman R. S., Alfirevic A., Pirmohamed M., *Clin. Infect. Dis.*, **56(9)**, 1330-1339 (2013).
- 21) Chantarangsu S., Mushiroda T., Mahasirimongkol S., Kiertiburanakul S., Sungkanuparph S., Manosuthi W., Tantisiriwat W., Charoenyingwattana A., Sura T., Chantratita W., Nakamura Y., *Pharmacogenet. Genomics*, **19(2)**, 139-146 (2009).
- 22) Martin A. M., Nolan D., James I., Cameron P., Keller J., Moore C., Phillips E., Christiansen F. T., Mallal S., *AIDS*, **19(1)**, 97-99 (2005).
- 23) Tassaneeyakul W., Tiamkao S., Jantararoungtong T., Chen P., Lin S. Y., Chen W. H., Konyoung P., Khunarkornsiri U., Auvichayapat N., Pavakul K., Kulkantrakorn K., Choonhakarn C., Phonhiamhan S., Piyatrakul N., Aungaree T., Pongpakdee S., Yodnopaglaw P., *Epilepsia*, **51(5)**, 926-930 (2010).
- 24) Yip V. L., Marson A. G., Jorgensen A. L., Pirmohamed M., Alfirevic A., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **92(6)**, 757-765 (2012).
- 25) Ko T. M., Tsai C. Y., Chen S. Y., Chen K. S., Yu K. H., Chu C.S., Huang C. M., Wang C. R., Weng C. T., Yu C. L., Hsieh S. C., Tsai J. C., Lai W. T., Tsai W. C., Yin G. D., Ou T. T., Cheng K. H., Yen J. H., Liou T. L., Lin T. H., Chen D. Y., Hsiao P. J., Weng M. Y., Chen Y.

- M., Chen C. H., Liu M. F., Yen H. W., Lee J. J., Kuo M. C., Wu C. C., Hung S. Y., Luo S. F., Yang Y. H., Chuang H. P., Chou Y. C., Liao H. T., Wang C. W., Huang C. L., Chang C. S., Lee M. T., Chen P., Wong C. S., Chen C. H., Wu J. Y., Chen Y. T., Shen C. Y.; Taiwan Allopurinol-SCAR Consortium, *BMJ*, **351**, h4848 (2015).
- 26) Cargnin S., Jommi C., Canonico P. L., Genazzani A. A., Terrazzino S., *Pharmacogenomics*, **15(7)**, 963-976 (2014).
- 27) Mallal S., Phillips E., Carosi G., Molina J. M., Workman C., Tomazic J., Jägel-Guedes E., Rugina S., Kozyrev O., Cid J. F., Hay P., Nolan D., Hughes S., Hughes A., Ryan S., Fitch N., Thorborn D., Benbow A., PREDICT-1 Study Team, *N. Engl. J. Med.*, **358(6)**, 568-579 (2008).
- 28) Small C.B., Margolis D.A., Shaefer M.S., Ross L.L., *BMC Infect. Dis.*, **17(1)**, 256 (2017).
- 29) Thomson A. W., Knolle P. A., *Nat. Rev. Immunol.*, **10(11)**, 753-766 (2010).
- 30) Yuan L., Kaplowitz N., *Clin. Liver Dis.*, **17(4)**, 507-518 (2013).
- 31) Dara L., Liu Z. X., Kaplowitz N., *Liver Int.*, **36(2)**, 158-165 (2016).
- 32) Iorga A., Dara L., Kaplowitz N., *Int. J. Mol. Sci.*, **18(5)**, 1018 (2017).
- 33) Gómez-Lechón M. J., Tolosa L., Conde I., Donato M. T., *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **10(11)**, 1553-1568 (2014).
- 34) Nakayama S., Atsumi R., Takakusa H., Kobayashi Y., Kurihara A., Nagai Y., Nakai D., Okazaki O., *Drug Metab. Dispos.*, **37(9)**, 1970-1977 (2009).
- 35) Gan J., Ruan Q., He B., Zhu M., Shyu W. C., Humphreys W. G., *Chem. Res. Toxicol.*, **22(4)**, 690-698 (2009).
- 36) Yuan L., Kaplowitz N., *Mol. Aspects Med.*, **30(1-2)**, 29-41 (2009).
- 37) Nadanaciva S., Will Y., *Curr. Drug Targets*, **12(6)**, 774-782 (2011).
- 38) Bajt M. L., Cover C., Lemasters J. J., Jaeschke H., *Toxicol. Sci.*, **94(1)**, 217-225 (2006).
- 39) Pedersen J. M., Matsson P., Bergström C. A., Hoogstraate J., Norén A., LeCluyse E. L., Artursson P., *Toxicol. Sci.*, **136(2)**, 328-343 (2013).
- 40) Akiba H., Kehren J., Ducluzeau M. T., Krasteva M., Horand F., Kaiserlian D., Kaneko F.,

- Nicolas J. F., *J. Immunol.*, **168(6)**, 3079-3087 (2002).
- 41) Monshi M. M., Faulkner L., Gibson A., Jenkins R. E., Farrell J., Earnshaw C. J., Alfirevic A., Cederbrant K., Daly A. K., French N., Pirmohamed M., Park B. K., Naisbitt D. J., *Hepatology*, **57(2)**, 727-739 (2013).
- 42) Wullemmin N., Adam J., Fontana S., Krähenbühl S., Pichler W. J., Yerly D., *J. Immunol.*, **190(10)**, 4956-4964 (2013).
- 43) Kim S. H., Saide K., Farrell J., Faulkner L., Tailor A., Ogeese M., Daly A. K., Pirmohamed M., Park B. K., Naisbitt D. J., *Hepatology*, **62(3)**, 887-899 (2015).
- 44) Pichler W. J., Beeler A., Keller M., Lerch M., Posadas S., Schmid D., Spanou Z., Zawodniak A., Gerber B., *Allergol. Int.*, **55(1)**, 17-25 (2006).
- 45) Clayton G. M., Wang Y., Crawford F., Novikov A., Wimberly B. T., Kieft J. S., Falta M. T., Bowerman N. A., Marrack P., Fontenot A. P., Dai S., Kappler J. W., *Cell*, **158(1)**, 132-142 (2014).
- 46) Wu Y., Sanderson J. P., Farrell J., Drummond N. S., Hanson A., Bowkett E., Berry N., Stachulski A. V., Clarke S. E., Pichler W. J., Pirmohamed M., Park B. K., Naisbitt D. J., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **118(1)**, 233-241 (2006).
- 47) Wei C. Y., Chung W. H., Huang H. W., Chen Y. T., Hung S. I., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **129(6)**, 1562-1569.e5 (2012).
- 48) Yun J., Marcaida M. J., Eriksson K. K., Jamin H., Fontana S., Pichler W. J., Yerly D., *J. Immunol.*, **192(7)**, 2984-2993 (2014).
- 49) Watkins S., Pichler W. J., *PLoS One*, **8(10)**, e76211 (2013).
- 50) Illing P. T., Vivian J. P., Dudek N. L., Kostenko L., Chen Z., Bharadwaj M., Miles J. J., Kjer-Nielsen L., Gras S., Williamson N. A., Burrows S. R., Purcell A. W., Rossjohn J., McCluskey J., *Nature*, **486(7404)**, 554-558 (2012).
- 51) Norcross M. A., Luo S., Lu L., Boyne M. T., Gomarteli M., Rennels A. D., Woodcock J., Margulies D. H., McMurtrey C., Vernon S., Hildebrand W. H., Buchli R., *AIDS*, **26(11)**, F21-29 (2012).

- 52) Ostrov D. A., Grant B. J., Pompeu Y. A., Sidney J., Harndahl M., Southwood S., Oseroff C., Lu S., Jakoncic J., de Oliveira C. A., Yang L., Mei H., Shi L., Shabanowitz J., English A. M., Wriston A., Lucas A., Phillips E., Mallal S., Grey H. M., Sette A., Hunt D. F., Buus S., Peters B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **109(25)**, 9959-9964 (2012).
- 53) Bernstein F. C., Koetzle T. F., Williams G. J., Meyer E.F. Jr., Brice M. D., Rodgers J. R., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M., *J. Mol. Biol.*, **112(3)**, 535-542 (1977).
- 54) Amari S., Kataoka R., Ikegami T., Hirayama N., *Int. J. Med. Chem.*, **2013**, 690513 (2013).
- 55) Wishart D. S., Knox C., Guo A. C., Cheng D., Shrivastava S., Tzur D., Gautam B., Hassanali M., *Nucleic Acids Res.*, **36(Database issue)**, D901-906 (2008).
- 56) Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2018.
- 57) Goto J., Kataoka R., Muta H., Hirayama N., *J. Chem. Inf. Model.*, **48(3)**, 583-590 (2008).
- 58) Corbeil C. R., Williams C.I., Labute P., *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **26(6)**, 775-786 (2012).
- 59) Humphrey W., Dalke A., Schulten K., *J. Mol. Graph.*, **14(1)**, 33-38 (1996).
- 60) Harvey M. J., Giupponi G., Fabritiis G. D., *J. Chem. Theory Comput.*, **5(6)**, 1632-1639 (2009).
- 61) Trott O., Olson A. J., *J. Comput. Chem.*, **31(2)**, 455-461 (2010).
- 62) Steere A. C., Klitz W., Drouin E. E., Falk B. A., Kwok W. W., Nepom G. T., Baxter-Lowe L. A., *J. Exp. Med.*, **203(4)**, 961-971 (2006).
- 63) Dieterich D. T., Robinson P.A., Love J., Stern J. O., *Clin. Infect. Dis.*, **38**, Suppl 2, S80-89 (2004).
- 64) Wit F. W., Kesselring A. M., Gras L., Richter C., van der Ende M. E., Brinkman K., Lange J. M., de Wolf F., Reiss P., *Clin. Infect. Dis.*, **46(6)**, 933-940 (2008).
- 65) Keane N. M., Pavlos R. K., McKinnon E., Lucas A., Rive C., Blyth C. C., Dunn D., Lucas M., Mallal S., Phillips E., *AIDS*, **28(13)**, 1891-1901 (2014).
- 66) Yuan J., Guo S., Hall D., Cammett A. M., Jayadevs., Distel M., Storfer S., Huang Z., Mootsikapun P., Ruxrungtham K., Podzamczar D., Haas D. W., Nevirapine Toxicogenomics

Study Team, *AIDS*, **25(10)**, 1271-1280 (2011).

- 67) Carr D. F., Bourgeois S., Chaponda M., Takeshita L. Y., Morris A. P., Castro E. M., Alfirevic A., Jones A. R., Rigden D. J., Haldenby S., Khoo S., Lalloo D. G., Heyderman R. S., Dandara C., Kampira E., van Oosterhout J. J. Ssali F., Munderi P., Novelli G., Borgiani P., Nelson M. R., Holden A., Deloukas P., Pirmohamed M., *J. Antimicrob. Chemother.*, **72(4)**, 1152-1162 (2017).
- 68) Haas D. W., Bartlett J. A., Andersen J. W., Sanne I., Wilkinson G. R., Hinkle J., Rousseau F., Ingram C. D., Shaw A., Lederman M. M., Kim R.B., Adult AIDS Clinical Trials Group, *Clin. Infect. Dis.*, **43(6)**, 783-786 (2006).
- 69) Isogai H., Hirayama N., *Chem-Bio. Inf. J.*, **16**, 9-12 (2016).
- 70) Rabinowitz J. D., Vrljic M., Kasson P. M., Liang M. N., Busch R., Boniface J. J., Davis M. M., McConnell H. M., *Immunity*, **9(5)**, 699-709 (1998).
- 71) Höpner S., Dickhaut K., Hofstätter M., Krämer H., Rückerl D., Söderhäll J. A., Gupta S., Marin-Esteban V., Kühne R., Freund C., Jung G., Falk K., Röttschke O., *J. Biol. Chem.*, **281(50)**, 38535-38542 (2006).
- 72) Gupta S., Höpner S., Rupp B., Günther S., Dickhaut K., Agarwal N., Cardoso M. C., Kühne R., Wiesmüller K. H., Jung G., Falk K., Röttschke O., *PLoS One*, **3(3)**, e1814 (2008).
- 73) Zaheer-ul-Haq, Khan W., *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **25(1)**, 81-101 (2011).
- 74) Pavlos R., McKinnon E. J., Ostrov D. A., Peters B., Buus S., Koelle D., Chopra A., Schutte R., Rive C., Redwood A., Restrepo S., Bracey A., Kaever T., Myers P., Speers E., Malaker S. A., Shabanowitz J., Jing Y., Gaudieri S., Hunt D. F., Carrington M., Haas D. W., Mallal S., Phillips E. J., *Sci. Rep.*, **7(1)**, 8653 (2017).
- 75) Isogai H, Miyadera H., Ueta M., Sotozono C., Kinoshita S., Tokunaga K., Hirayama N., *J. Toxicol.*, **2013**, 514068 (2013).
- 76) Osabe M., Tohkin M., Hirayama N., *Chem-Bio. Inf. J.*, **16**, 1-4 (2016).
- 77) Petukh M., Wu B., Stefl S., Smith N., Hyde-Volpe D., Wang L., Alexov E., *PLoS One*, **9(11)**, e111604 (2014).

- 78) Lee W. M., Larrey D., Olsson R., Lewis J. H., Keisu M., Auclert L., Sheth S., *Drug Saf.*, **28(4)**, 351-370 (2005).
- 79) Neve E. P., Köfeler H., Hendriks D. F., Nordling Å., Gogvadze V., Mkrtchian S., Näslund E., Ingelman-Sundberg M., *PLoS One*, **10(9)**, e0138487 (2015).
- 80) Eriksson U. G., Bredberg U., Hoffmann K. J., Thuresson A., Gabrielsson M., Ericsson H., Ahnoff M., Gislén K., Fager G., Gustafsson D., *Drug Metab. Dispos.*, **31(3)**, 294-305 (2003).
- 81) Moy B., Rappold E., Williams L., Kelly T., Nicolodi L., Maltzman J. D., Goss P. E., *J. Clin. Oncol.*, **27**, 1043 (2009).
- 82) Parham L. R., Briley L. P., Li L., Shen J., Newcombe P. J., King K. S., Slater A. J., Dilthey A., Iqbal Z., McVean G., Cox C. J., Nelson M. R., Spraggs C. F., *Pharmacogenomics J.*, **16(2)**, 180-185 (2016).
- 83) Towles J. K., Clark R. N., Wahlin M. D., Uttamsingh V., Rettie A. E., Jackson K. D., *Drug Metab. Dispos.*, **44(10)**, 1584-1597 (2016).
- 84) Teo Y. L., Saetaew M., Chanthawong S., Yap Y. S., Chan E. C., Ho H. K., Chan A., *Breast Cancer Res. Treat.*, **133(2)**, 703-711 (2012).
- 85) Michels A. W., Ostrov D. A., Zhang L., Nakayama M., Fuse M., McDaniel K., Roep B. O., Gottlieb P. A., Atkinson M. A., Eisenbarth G. S., *J. Immunol.*, **187(11)**, 5921-5930 (2011).
- 86) Ji N., Somanaboeina A., Dixit A., Kawamura K., Hayward N. J., Self C., Olson G. L., Forsthuber T. G., *J. Immunol.*, **191(10)**, 5074-5084 (2013).
- 87) Liu Z., Li B., Li X., Zhang L., Lai L., *J. Chem. Inf. Model.*, **51(2)**, 326-334 (2011).
- 88) Li C. W., Menconi F., Osman R., Mezei M., Jacobson E. M., Concepcion E., David C. S., Kastrinsky D. B., Ohlmeyer M., Tomer Y., *J. Biol. Chem.*, **291(8)**, 4079-4090 (2016).
- 89) Afridi S., Hoessli D. C., Hameed M. W., *Immunol. Rev.*, **272(1)**, 151-168 (2016).
- 90) Naisbitt D. J., Yang E. L., Alhaidari M., Berry N. G., Lawrenson A. S., Farrell J., Martin P., Strebel K., Owen A., Pye M., French N. S., Clarke S. E., O'Neill P. M., Park B. K., *AIDS*, **29(18)**, 2385-2395 (2015).

- 91) Marsh S. G., Albert E. D., Bodmer W. F., Bontrop R. E., Dupont B., Erlich H. A.,
Fernández-Viña M., Geraghty D. E., Holdsworth R., Hurley C. K., Lau M., Lee K. W., Mach
B., Maiers M., Mayr W. R., Müller C. R., Parham P., Petersdorf E. W., Sasazuki T.,
Strominger J. L., Svejgaard A., Terasaki P. I., Tiercy J. M., Trowsdale J., *Tissue Antigens*,
75(4), 291-455 (2010).
- 92) Salvat R., Moise L., Bailey-Kellogg C., Griswold K. E., *J. Vis. Exp.*, **85**, e51308 (2014).
- 93) Watanabe N., Suzuki Y., Yonezu T., Nakagawa Y., Shiina T., Hirayama N., Inokuchi S.,
Inoue S., *Sci. Rep.*, **7(1)**, 6798 (2017).

謝辞

本研究論文の作成にあたり、懇篤なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科 佐藤匡史准教授に深甚なる謝意を表します。また、多くの有益な御助言と御指導を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科 平嶋尚英教授、肥田重明教授ならびに頭金正博教授に心から御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、数々の御助言ならびに御指導、御鞭撻を賜りました東海大学先進生命科学研究科 所長 平山令明特任教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始御指導、ご支援頂きました第一三共株式会社 薬物動態研究所 前所長 泉高司博士ならびに現所長 安東治博士に厚く御礼申し上げます、また、常に貴重なご指導、御助言を頂きました第一三共株式会社 萩原克宣博士に深く感謝致します。さらに、本研究にご協力頂きました第一三共株式会社 奥平典子博士ならびに安部康司博士に深謝致します。

2019年3月