

86. HLA 遺伝子導入動物を用いた特異体質毒性メカニズム研究

伊藤 晃成

千葉大学 大学院薬学研究院 生物薬剤学

Key words : 特異体質性, HLA, モデル動物, 個別医療

緒言

薬物毒性は、投与量依存的な中毒性と、投与量非依存的な特異体質性に大別され、前者は非臨床試験レベルである程度予測可能である一方、後者は動物での再現は困難であり、ヒトにおいても稀にしか起こらず、医薬品の開発段階で見出すことは困難とされている。近年、薬物による特異体質毒性の発症とヒト白血球抗原 (HLA) との関連性が数多く報告されている¹⁾。しかし、*HLA* 多型保有者皆が毒性を発現するとは限らないこと、特定の組織において傷害が認められることなど、数多くの問題が残されている。それらの問題に対して前向きに取り組むため、我々は HLA を発現する遺伝子改変マウスを作出し、特異体質毒性を動物で再現すること、さらにその機序を詳細に明らかとすることを目的に研究を開始した。特に、*HLA-B*57:01* 多型と関連するアバカビル服用による皮疹の発症、およびフルクロキサリニン服用による肝障害の発症に焦点を当て、特異体質毒性の再現に向けた検討を行った。

方法および結果

1. HLA 導入マウス作出に係るキメラ型 *HLA* 遺伝子の構築とその機能確認

ヒト HLA を高発現する遺伝子導入マウスを作出するにあたり、まず発現ベクターの構築を行った (図 1A)。HLA タンパク質は約 40 kDa の α 鎖と約 10 kDa の β_2 ミクログロブリン (β_{2m}) から成る二量体である。 α 鎖は各 95 個のアミノ酸からなる 3 個の細胞外ドメイン (a_1 , a_2 , a_3) と膜貫通領域および細胞内領域から構成されている。その a_1 ~ a_3 から成る *HLA-B*57:01* 遺伝子のうち、 a_3 ドメインはマウス T 細胞による認識に重要な領域であり、マウス型に置換したキメラ型 *HLA-B*57:01* 遺伝子を構築した。さらに、導入した HLA の細胞表面上での安定性を向上させるために、ヒト β_{2m} 遺伝子をピコルナウイルス由来のポリシストロン配列 (2A peptide 配列) を介してキメラ型 *HLA* 遺伝子と繋ぎ、2 つの遺伝子の共導入を図った。また、HLA 複合体を免疫沈降するために、キメラ型 *HLA* 遺伝子の C 末に FLAG タグを付加した。また、陰性対照として、*HLA-B*57:01* との 2 塩基多型 (412 番目 : G→A, 419 番目 : C→A) である *HLA-B*57:03* 遺伝子を発現するベクターも同様に作製した。ベクターは、マウス全身に高発現を期待できる CAG vector を用いた。

キメラ型 *HLA-B*57:01/57:03* 遺伝子発現ベクターを HeLa 細胞に導入し、HLA の細胞表面発現量をフローサイトメトリーによって評価したところ、細胞表面上での HLA 発現を認めた (図 1B)。次に、キメラ型 HLA タンパク質の機能確認を抗ウイルス薬であるアバカビルを用いて行った。これまでの報告から、HLA-B*57:01 タンパク質内のポケットにアバカビルが結合し、それによって提示されるペプチドレパートリーの変化が生じ、異物認識による細胞傷害・皮疹発症に繋がるものと考えられている²⁾。そこで、HeLa 細胞にキメラ型 *HLA-B*57:01/57:03* 遺伝子発現ベクターを導入した後に FLAG タグを介して HLA 複合体を免疫沈降し、提示されたアバカビル量を LC-MS/MS によって定量した。その結果、免疫沈降サンプルから β_{2m} の発現を確認することができ (図 1C)、過去の報告と同様に HLA-B*57:01 特異的なアバカビルの提示を認めることもできた (図 1D)。

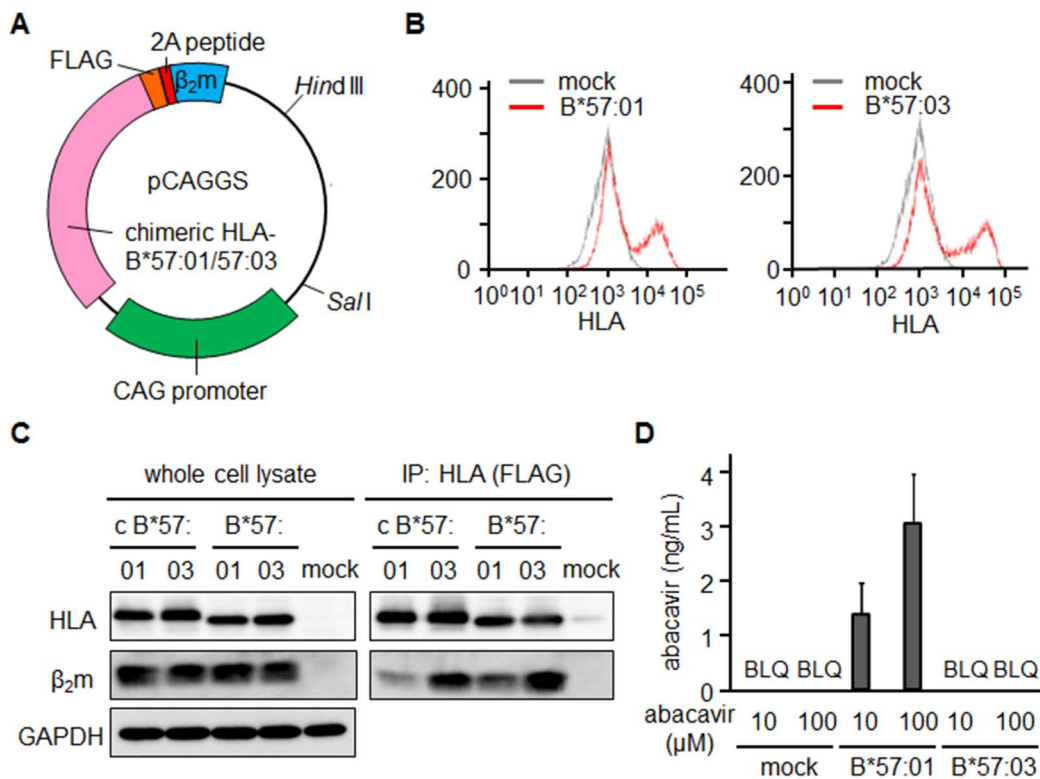


図1. キメラ型 *HLA* 遺伝子の構造と *in vitro* における機能確認

(A) キメラ型 *HLA-B*57:01/57:03* 遺伝子発現ベクターの構造。2種類の制限酵素 (*Sal*I および *Hind* III) で消化した遺伝子断片をマウスの受精卵に導入した。(B) 構築した発現ベクター (キメラ型 *HLA-B*57:01* または *57:03*) を HeLa 細胞に導入し、細胞表面上の *HLA* 発現を *HLA* 抗体を用いてフローサイトメトリーによって評価した。(C) キメラ型 *HLA* 遺伝子 (c *B*57:*) または *HLA* 遺伝子 (*B*57:*) を HeLa 細胞に導入し、アバカビルの添加 24 時間後に細胞を可溶化し、*HLA* 複合体を FLAG 抗体ビーズを用いて免疫沈降 (IP) した。その後、免疫ブロット法によって *HLA* 複合体の免疫沈降の評価を行った。(D) (C) の免疫沈降サンプルに対して、アバカビル含量を LC-MS/MS によって評価し、溶出液中の濃度として示した。BLQ: 定量下限以下、サンプル数: 3、誤差範囲: SD。

2. キメラ型 *HLA* 遺伝子導入マウスにおける免疫担当細胞における導入 *HLA* タンパク質発現の確認

キメラ型 *HLA-B*57:01/57:03* 遺伝子導入マウス、およびそのリッターメイト WT マウスの頸静脈血より末梢血単核細胞 (PBMC) の単離・精製を行った。それらに対して、*HLA* および β_{2m} に対する抗体を用いてフローサイトメトリーまたは免疫ブロット法によって、それぞれの発現確認を行った。その結果、PBMC 由来のリンパ球の細胞表面上に *HLA* タンパク質の発現を認めることができ (図 2A)、2A peptide で連結させた β_{2m} の発現も確認された (図 2B)。

さらに、免疫担当細胞である樹状細胞における *HLA* 発現を、樹状細胞マーカーである CD11c に対する抗体を用いて共染色し、*HLA* を発現した樹状細胞が PBMC 中にどの程度存在しているか、フローサイトメトリーによって検証した。その結果、単離した PBMC のうち約 2~5% が樹状細胞であることが示され、これまでに報告されている結果を反映するものであったことと同時に、樹状細胞上に導入 *HLA* の発現を確認することができた (図 2C)。

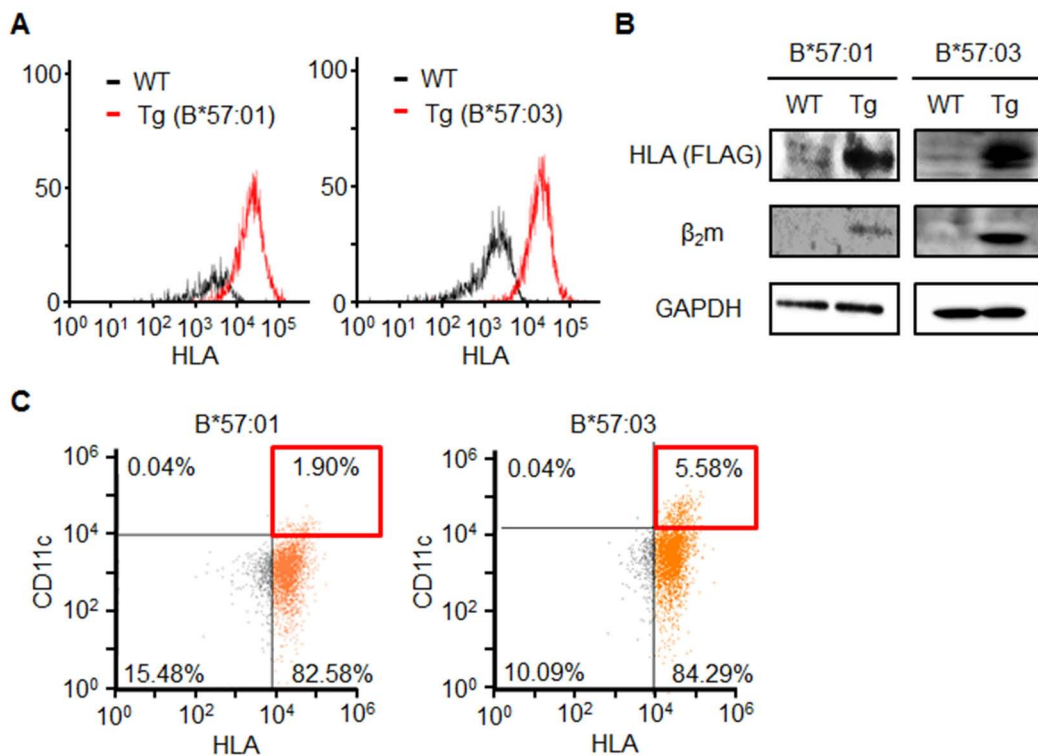


図2. キメラ型 *HLA* 遺伝子導入マウス由来 PBMC における導入 HLA タンパク質の発現量評価

(A) キメラ型 *HLA-B*57:01/57:03* 遺伝子導入マウスより PBMC を単離・精製し、そこにおける表面 HLA 発現量をリッターメイトの WT マウス由来のそれらと比較した。(B) (A) で用いた PBMC を可溶化し、導入した HLA および β_2m のタンパク質発現量をイムノブロット法によって評価した。(C) (A) で用いた PBMC に対して、HLA および樹状細胞マーカーである CD11c に対する抗体を用いて共染色を行い、フローサイトメトリーによって展開した。赤枠は、HLA および CD11c の両陽性画分を示した。

3. キメラ型 *HLA* 遺伝子導入マウスにおける各臓器中の導入 HLA 発現量の評価

キメラ型 *HLA-B*57:01* 遺伝子導入マウス、およびそのリッターメイトの WT マウスより各種臓器を単離し、導入 HLA の遺伝子発現量の確認を半定量的 PCR 法によって行った。その結果、検討した全臓器において導入 *HLA* 遺伝子の発現を認めた (図 3A)。さらに、キメラ型 *HLA-B*57:01/57:03* 遺伝子導入マウス、およびそのリッターメイトの WT マウスより脾臓および胸腺を単離し、ホモジネートサンプルを作製した後に臓器中 HLA タンパク質発現量の評価をイムノブロット法により行った。その結果、HLA および β_2m のタンパク質発現をキメラ型 *HLA* 遺伝子導入マウスのみにおいて認め (図 3B)、構築したマウスを用いて導入 HLA タンパク質の機能評価が適切に行えるものと考えられた。

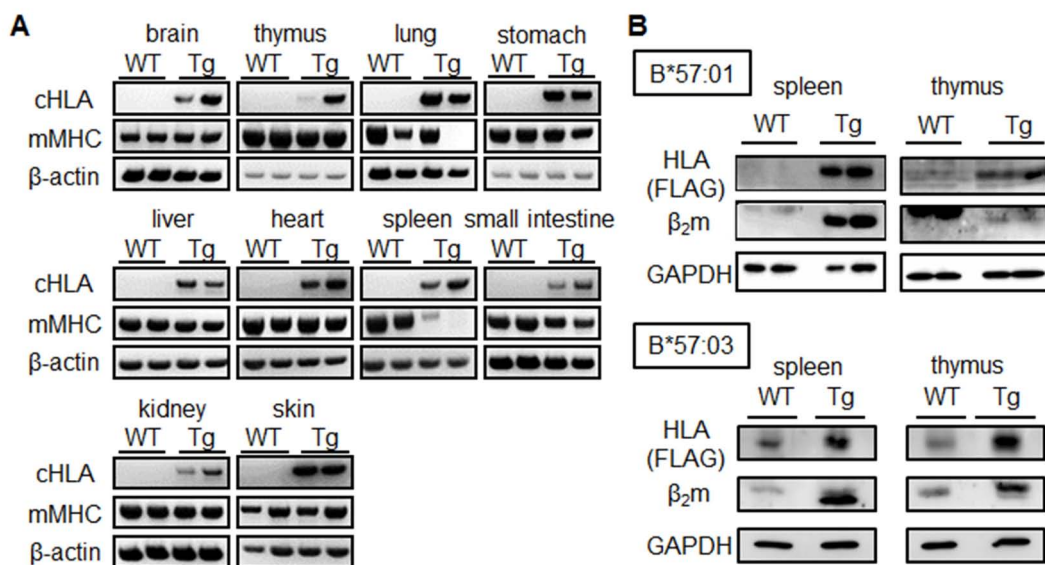


図3. キメラ型 *HLA* 遺伝子導入マウスにおける各臓器中の導入 *HLA* 発現量評価

(A) キメラ型 *HLA-B*57:01* 遺伝子導入マウスより各種臓器（脳、胸腺、肺、胃、肝臓、心臓、脾臓、小腸、腎臓、皮膚）を単離し、導入 *HLA* 遺伝子発現量の確認を *Taq* polymerase を用いた半定量的 PCR 法によって行い、リッターメイトの WT マウス由来のそれらと比較した。cHLA：キメラ型 *HLA* 遺伝子、mMHC：マウス内因性 *MHC* 遺伝子。(B) キメラ型 *HLA-B*57:01/57:03* 遺伝子導入マウスより脾臓および胸腺を単離した後にホモジネートサンプルを作製し、*HLA* および β_2m のタンパク質発現量をイムノブロット法によって確認した。それぞれ、リッターメイトの WT マウス由来のそれらと比較した。

考 察

本研究から、ヒト *HLA* 機能を有すると考えられる遺伝子導入マウスの作出に成功した。本マウスでは、樹状細胞を含む PBMC、および各種臓器に *HLA* タンパク質の発現が認められたことから、ヒトで報告されているアバカビルによる過敏症様症状、ならびにフルクロキサシリン服用による肝障害症状をマウスで再現できるものと期待される。現在、本マウスを用いて薬物を曝露した際の毒性発現の評価を試みているところである。

また、本マウス由来の毒性発現標的細胞（アバカビルの場合はケラチノサイト、フルクロキサシリンの場合は肝細胞）、および T 細胞を、免疫応答を媒介する樹状細胞を含めて共培養することによって *in vitro* において毒性発現を再現することも可能になると考えており、臓器特異性を含めた毒性惹起にいたるメカニズム解明も加速的に進むものと想定している。

共同研究者

本研究の共同研究者は、千葉大学大学院薬学研究院生物薬剤学研究室の青木重樹、関根秀一である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深謝いたします。

文 献

- 1) Daly AK. Using genome-wide association studies to identify genes important in serious adverse drug reactions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2012;52:21-35. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134743. PubMed PMID: 21819236.
- 2) Illing PT, Vivian JP, Dudek NL, Kostenko L, Chen Z, Bharadwaj M, et al. Immune self-reactivity triggered by drug-modified *HLA*-peptide repertoire. *Nature.* 2012;486(7404):554-8. doi: 10.1038/nature11147. PubMed PMID: 22722860.