

HLA-A*33:03とチクロピジン関連化合物の相互作用の *in silico* 解析

In silico Analysis of Interactions between HLA-A*33:03 and Ticlopidine-related Compounds

磯貝 秀人¹⁾、平山 令明²⁾

¹⁾東海大学医学部・基礎医学系、²⁾東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門

Hideto Isogai¹⁾ and Noriaki Hirayama²⁾

¹⁾ Basic Medical Science and Molecular Medicine, Tokai University School of Medicine

²⁾ Division of Pharmaceutical Sciences, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

チクロピジンは血小板凝集抑制剤として広く使われているが、中毒性表皮融解症や重篤な肝障害を引き起こす。これらの副作用は特異体質性薬物毒性(IDT)であり、その発症に *HLA-A*33:03* が深く関与していることが報告されている。チクロピジンは体内で代謝され、様々な代謝産物が生じるが、どの代謝産物が IDT に関与するか明らかではなかった。本研究では、種々の代謝物と *HLA-A*33:03* との相互作用を *in silico* 解析し、チクロピジン S - オキシド二量体が IDT 発症に関与する可能性が最も高いことを示した。

[Abstract]

Ticlopidine, a well-known antiplatelet agent, has been reported as a common cause of hepatotoxicity and severe cutaneous adverse reactions. The metabolism of ticlopidine is complex because of extensive oxidation in the liver. It is of interest to identify the metabolite which is likely to be responsible for the adverse reactions. Since a strong association between ticlopidine-induced adverse reactions and *HLA-A*33:03* has been observed, binding of ticlopidine-related compounds to *HLA-A*33:03* must be important for the onset of the adverse reactions. In this study, using the three-dimensional structure of *HLA-A*33:03* constructed by homology modeling, the binding modes and affinities between various ticlopidine-related compounds and *HLA-A*33:03* were simulated by docking simulations. The result has indicated that ticlopidine S-oxide dimer should be mostly responsible for the toxicity.

[Key Words]

idiosyncratic drug toxicity, ticlopidine, *HLA-A*33:03*, docking simulation

1.はじめに

医薬品の副作用発生を完全に防ぐことは難しく、多くの医薬品開発が副作用発生により中断される。しかし、研究開発の過程での毒性予測、特に慢性毒性の予測はこれまで困難であった。特に患者の特異体質によって発症する副作用 (idiosyncratic drug toxicity: IDT) の予測は非常に困難である。また発生頻度が少ないことから、その医薬品が市販され、多くの患者に投与されてから初めて副作用が明らか

にされる事が多い。

幸いなことに、近年の遺伝子解析の精密化および迅速化により、特定の IDT が特定の型の主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC) と相関するという事実が明らかにされて来た。人間の場合、MHC はヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen: HLA) と呼ばれる。しかし、特定の医薬分子と特定の型の HLA の相互作用に関する詳しい分子メカニズムは最近まで明らかでなかった。

アバカビルはエイズの治療に広く用いられているが、重篤な IDT (胃腸障害および発疹) を示すことが知られている。近年この副作用は *HLA-B*57:01* という型の HLA を保有する患者に高い頻度で見られることが、遺伝子解析から明らかになった。オッズ比は 117.5[1] であり、この HLA は IDT を発症した患者の 78%に見られる。2012 年になり、Illing らは X 線結晶解析により、アバカビルと *HLA-B*57:01* が直接的に結合することを確認した[2]。しかし、このような実験は技術的に難しく、他の IDT を発症する医薬分子についての研究は大きく立ち遅れているのが現状である。

一方、コンピュータ科学の進歩により、近年の *in silico* シミュレーション技術の発展には目覚ましいものがあり、シミュレーションでウェット実験に近い結果を得ることが可能になって来ている。従って、相互作用を予測すべき医薬分子と HLA 分子の立体構造が得られれば、実験的に決定することが難しい相互作用を *in silico* で、かつ高い精度で予測することが可能である。特に IDT のように、多くの患者の QOL を犠牲にしてから明らかになるような副作用を事前に予測することの意義は非常に高い。そこで、我々は数年前から、HLA 分子が絡む IDT 予測の研究を開始している。この報告ではこれら一連の研究の一つについて述べる。

チクロピジン(Fig.1)は広く使用されている血小板凝集抑制剤の一つである。しかし、チクロピジンは典型的な IDT の一つである中毒性表皮壊死融解症だけでなく、重篤な肝障害も示す。この肝障害の発症が *HLA-A*33:03* と有意に相関することが第一三共グループにより報告されている[3]。その報告

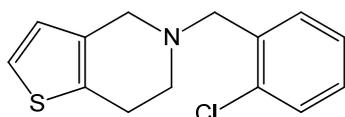


Fig.1. チクロピジン

によると、*HLA-A*33:03* を保有する患者は有意に肝機能障害を起こし、オッズ比が 36.5 という高い数字を示した。チクロピジンは体内に投与されると代謝される。チクロピジン自身も含めこれら代謝産物のどの分子がこの副作用に関係しているのは明らかになっていない。

そこで本研究では、チクロピジンの代謝化合物を予測し、それらの化合物と *HLA-A*33:03* との結合性を *in silico* 解析することにより、肝機能障害を引き起こす可能性のある分子種を推定することにした。

2. 結果の概要

2-1) *HLA-A*33:03* の立体構造予測

*HLA-A*33:03* の立体構造は実験的に決定されていないので、その立体構造をまず予測した。EBI (European Bioinformatics Institute) から公開されている *HLA-A*33:03* のアミノ酸配列を使用した。ホモロジー・モデル構築に用いる鋳型構造を選択するために、Protein Data Bank(PDB)[4]で公開されている 10 タイプの HLA 分子のアミノ酸配列と *HLA-A*33:03* のアミノ酸配列の一致度を算出した。評価対象領域は 1 領域と 2 領域とし、UID:1~182 までのアミノ酸残基とした。評価対象領域において、もっとも高い配列一致度を有するアレルは *HLA-A*68:01* であり、配列一致度は 94.5%である。そこで、*HLA-A*68:01* を鋳型構造に使用した。PDB で公開されている構造の内、R 因子、分解能、原子の占有率の指標から高質な分子構造であると判断できる構造 1TMC を鋳型構造として選択した。モデル構造構築には、統合計算システム MOE[5]に搭載されている MOE-Homology Model 機能を使用した。構築した主鎖構造の二面角を Ramachandran plot で検討した所、異常な構造は見られなかった。

2-2) ticlopidine の代謝産物の化学構造

代謝化合物については、第一三共グループがラットを使用した *in vivo* および *in vitro* の実験で 16 化合物を報告している[6]。ただし、活性代謝物については、この報告での化学構造と PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) で公開されている化学構造は異なっている。活性代謝物としてどちらの化学構造が妥当なのかは判断できないため、PubChem の化学構造も計算対象に含めた

一方、MetaDrug (ver. 6.9 Build 30881, GeneGo Inc., St. Joseph, MI) Meteor (ver. 13.0.0, LHASA Ltd., Leeds, UK) および MetaSite (ver. 3.1.2, Molecular Discovery Ltd., London, UK) を用いて、代謝化合物を予測した。予測された化合物は 255 種であり、先の 17 化合物との重複を省くと、260 化合物になった。これらの内、細胞膜を通過する可能性のある化合物は負の logP は持たないと判断されるので、logP の計算値 SlogP<0 の化合物を除いた合計 128 化合物を続くドッキング計算に使用した。

2-3) ドッキング・シミュレーション

ドッキング・シミュレーションには、我々が開発したソフトウェア ASEDock[7]を用いた。このソフトウェアは、受容体表面の窪みの形状を偽原子でモデル化し、それに適合するリガンドの立体配座を高速に探索

デルを考える。重なり具合を、ASE モデルとリガンドの原子間距離のガウス関数で評価して ASE スコアとした。即ち、リガンド原子がポケット内の偽原子と重なるとスコアは良くなり、逆にタンパク質原子と重なると悪くなる。リガンドの各立体配座との重ね合わせ

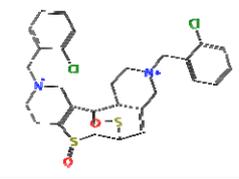
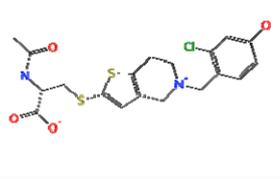
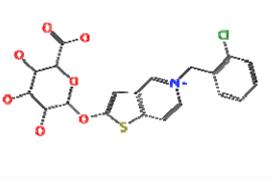
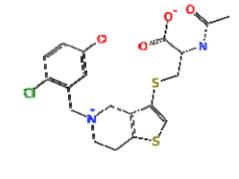
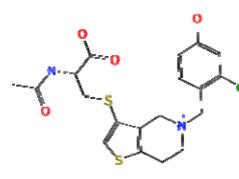
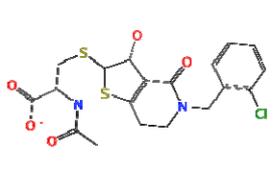
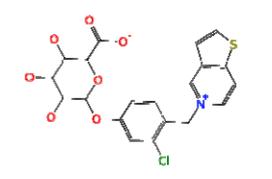
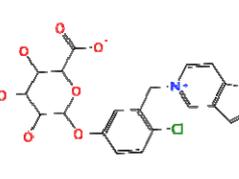
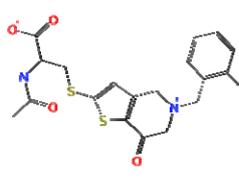
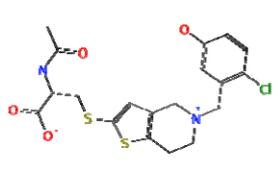
#230 (2.6145, -9.7)	#162 (1.1278, -9.4)	#170 (0.0932, -9.3)	#161 (1.1278, -9.2)
			
#163 (1.1278, -9.1)	#181 (1.0144, -9.1)	#169 (0.0932, -9.1)	#168 (0.0932, -9.0)
			
#155 (1.0624, -9.0)	#160 (1.1278, -8.9)		
			

Fig.2. HLA-A*33:03との結合性が最も高い10個の代謝産物。カッコ内の最初の数字はSlogP値を、2番目の値はGBVI/WSA_dGを示す

するプログラムである。このソフトウェアは大きく分けて、4段階で実行される。第1は、リガンド分子が結合する部位の表現である。多くの場合、リガンドはタンパク質表面の窪みまたはポケットに結合する。これらの部位を、統合計算化学システムであるMOEに搭載されているAlpha Site Finderにより、アルファ球の集合として表現する。第2は、リガンドが取り得る可能な立体配座の発生である。本研究では、分子をフラグメントに分割し、フラグメント毎に配座解析を行い、それらを組合せて分子配座を発生する手法を用いて立体配座を生成した。また、各分子はHLA原子に結合した時に、異なる互変異性体やプロトン化状態を取ることができるので、各分子に対して最大10個のそのような状態を生成し、それら全てを独立分子とみなして、配座解析を行った。第3は、リガンド分子のドッキングである。この為には、アルファ球で表現された部位を偽原子として考え、リガンドの原子と重ね合わせを行う。その際、リガンドが侵入できないタンパク質原子が占める空間を、排除体積として扱うASEモ

は最初、剛体のままで行う。第4は、先に得られた重ね合わせの良い配座を用い、タンパク質との相互作用をポテンシャル関数で表現し、ポテンシャル関数を最適化することにより、最適な構造と位置を求める。本研究では、HLA分子の骨格原子は固定し、リガンド原子も含め、それ以外の原子はすべて自由に動かす条件で、構造の最適化を行った。溶媒効果はBorn近似で行い、ポテンシャル関数にはAmber 10:EHT[8]を用いた。最適構造の評価を行う関数にはGBVI/WSA_dG[9]を用いた。

2-4) 結果

GBVI/WSA_dGが最も低くなった10化合物の化学構造をその分子のlogPの計算値とGBVI/WSA_dG値と共にFig.2に示す。本研究の結果、チクロピジンの代謝化合物のうち、HLA-A*33:03への結合親和性が最も高い化合物として、S-oxide体の二量体(Fig.3)がドッキング計算により予測された。一方、チクロピジンラットに投与して代謝化合物を検討した結果、胆汁代謝化合物としてS-oxide体のグルタチオン抱合体

が単離同定され、生体内で反応性の高いS-oxide 体が

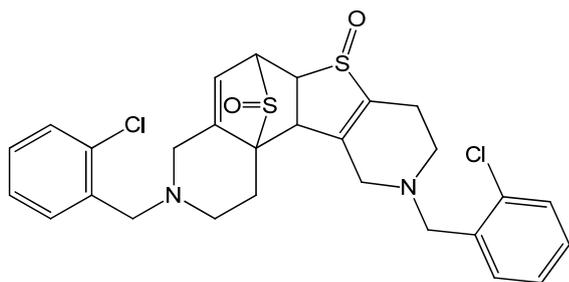


Fig.3. S-oxide 体の二量体の構造

生成されていることが第一三共グループにより報告されている[6]。S-oxide 体の二量体は *in vivo* の系では検出されていないが、*in vitro* の系では構造分析により検出されている。S-oxide 体の二量体は細胞膜を通過することが期待できるほど脂溶性の高い化合物であり、*HLA-A*33:03* への結合親和性の高い化合物であることが *in silico* 計算により予測された。Fig.4 に本研究で明らかになった S-oxide 体の二量体と *HLA-A*33:03* との相互作用の様子を示す。S-oxide 体の二量体は *HLA-A*33:03* の抗原ペプチド結合部位の比較的深い位置に結合する。

本研究は、チクロピジンの IDT 発症において、S-oxide 体の二量体は非常に重要な関与をしていることを示し、IDT 発症を考える上でこの化合物の血中濃度に注目すべきことを示唆した。本研究で得られた知見を活用することで、IDT 軽減への方策の検討につながる事が期待される。

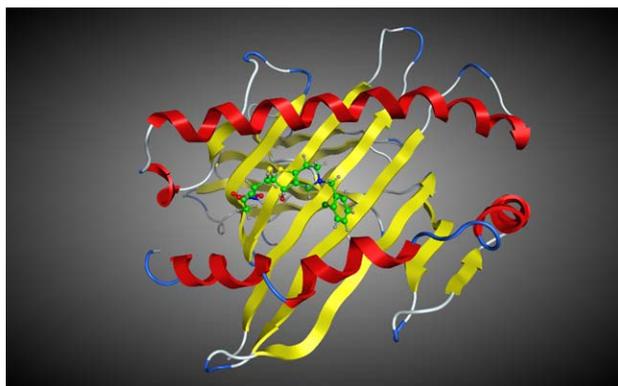


Fig.4. *HLA-A*33:03* に結合するチクロピジンの代謝産物の一つである S-oxide 体の二量体 (中央の緑色の分子)

3. 引用文献

- [1] S.Millal *et al.*, *Lancet*, **359**, 727(2002)
- [2] P.T.Illing, *et al.*, *Nature*, **486**,554(2012)

- [3] K.Hirata, *et al.*, *Pharmacogenomics J.*, **8**, 29(2008)
- [4] F.C.Bernstein, *et al.*, *J.Mol.Biol.*, 112, 535(1977)
- [5] MOE(molecular Operating Environment), 2014.09: Chemical Computing Group: Montreal, Canada, (2014)
- [6] S.Shimizu, *et al.*, *Drug. Metab. Dispos.*, **37**, 1904(2009)
- [7] J.Goto, *et al.*, *J.Chem.Inf.Model*, **48**, 583(2008)
- [8] D.A.Case, *et al.*, AMBER 12, University of California, San Francisco (2012)
- [9] C.R.Corbeil, *et al.*, *J.Comput.-Aided Mol.Des.*, **26**, 775 (2012)

4. 業績

【論文発表】

- 1) H.Miyadera, T.Ozeki, T.Mushiroda, N.Hirayama. *In silico* Analysis of Interactions between *HLA-A*31:01* and carbamazepine-related Compounds. *Chem-Bio Inf. J.*, **16**, 5-8(2016)
- 2) H.Isogai, N.Hirayama. *In silico* Analysis of Interactions between Nevirapine-related Compounds, *HLA-B*14:02* and T-cell Receptor. *Chem-Bio Inf. J.*, **16**, 9-12(2016)
- 3) T.Mabuchi, N.Hirayama. Binding Affinity and Interaction of LL-37 with *HLA-C*06:02* in Psoriasis. *J.Invest. Dermatol.* **136**,1901-1903(2016)
- 4) Y.Kametani, S.Ohshima, A. Miyamoto, A. Shigenari, M. Takasu, N. Imaeda, M. Tanaka, T.Shiina, H. Kamiguchi, H. Kitagawa, J. K. Kulski, N. Hirayama, H.Inoko, A. Ando. Production of a Locus- and Allele-Specific Monoclonal Antibody for the Characterization of SLA-10401 mRNA and Protein Expression Levels in MHC-Defined Microminipigs. *PLOS ONE*, **11**:e0164995 (2016)
- 5) N.Hirayama. Docking Simulations between Drugs and HLA Molecules Associated with Idiosyncratic Drug Toxicity." *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **32**,31-39(2017)

【学会等発表】

- 1) Noriaki Hirayama : Prediction of HLA-associated idiosyncratic drug toxicity (IDT). *21st EuroQSAR*, 2016.9.6 Verona (Italy)
- 2) 平山令明: 薬物と HLA のドッキングシミュレーション。日本薬物動態学会 第 31 回年会、2016.10.13 松本