

HLA-B*57:01 を介したフルクロキサシリンの副作用発現の分子機構

Molecular mechanism of the adverse drug reaction of flucloxacillin associated with HLA-B*57:01

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

Hideto Isogai¹⁾ and Noriaki Hirayama²⁾

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

²⁾ Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

ペニシリン系抗生物質である感染症治療薬であるフルクロキサシリン (FX) の特異体質性薬物毒性 (idiosyncratic drug toxicity: IDT) は HLA-B*57:01 の発現と密接に関係することが知られている。しかしながら、どのような分子機構で IDT が発現されるかは現在でも不明である。本研究では、HLA-B*57:01 に結合した FX およびその主な代謝化合物がどのように T-cell receptor と相互作用して IDT 発現に至るかをドッキング・シミュレーションに基づいて解析し、最も IDT 発現に関与すると思われる化合物を推定した。

[Abstract]

An antibiotic flucloxacillin (FX) which is used for the treatment of staphylococcal infection, is known to cause idiosyncratic drug toxicity (IDT). A genome-wide association study has shown that IDT induced by FX is associated with HLA-B*57:01. It is supposed that FX or its metabolites are bound to HLA-B*57:01, then the complexes would bind to T-cell receptor leading to the onset of IDT. In this study, we have undertaken docking simulations of the interactions between these molecules to understand molecular mechanisms of IDT caused by FX.

[Key Words]

idiosyncratic drug toxicity, flucloxacillin, HLA-B*57:01, docking simulation

1. はじめに

ペニシリン系抗生物質であるフルクロキサシリン (FX) は、とくに皮膚や皮膚組織、気道の感染症の治療薬として用いられている。しかし、FX は過敏性症候群および肝機能障害等のいわゆる特異体質性薬物毒性 (idiosyncratic drug toxicity: IDT) を示すことが知られている [1]。IDT の発現機構は複雑であり、多くのことが未だに不明であるが、近年の遺伝子解析により、FX の場合は HLA-B*57:01 の発現とこれらの副作用発現の間に高い相関のあることが報告されている [2]。

IDT が特定の HLA 分子とどのように相互作用するかについては長い間不明であったが、最近になり、抗 HIV 治療薬として用いられている核酸系逆転写酵素阻害剤の 1 つであるアバカビル (ABC) の IDT は、ABC と肝

機能障害の遺伝子マーカーである HLA-B*57:01 との直接的な結合に起因することが X 線結晶解析により示され [3]、特定の HLA 分子を介した医薬分子の副作用発現の分子メカニズムの 1 つが初めて明らかにされた。従って、FX の副作用発現分子メカニズムも FX ないしその代謝産物と HLA-B*57:01 分子との直接的な相互作用である可能性が高い。

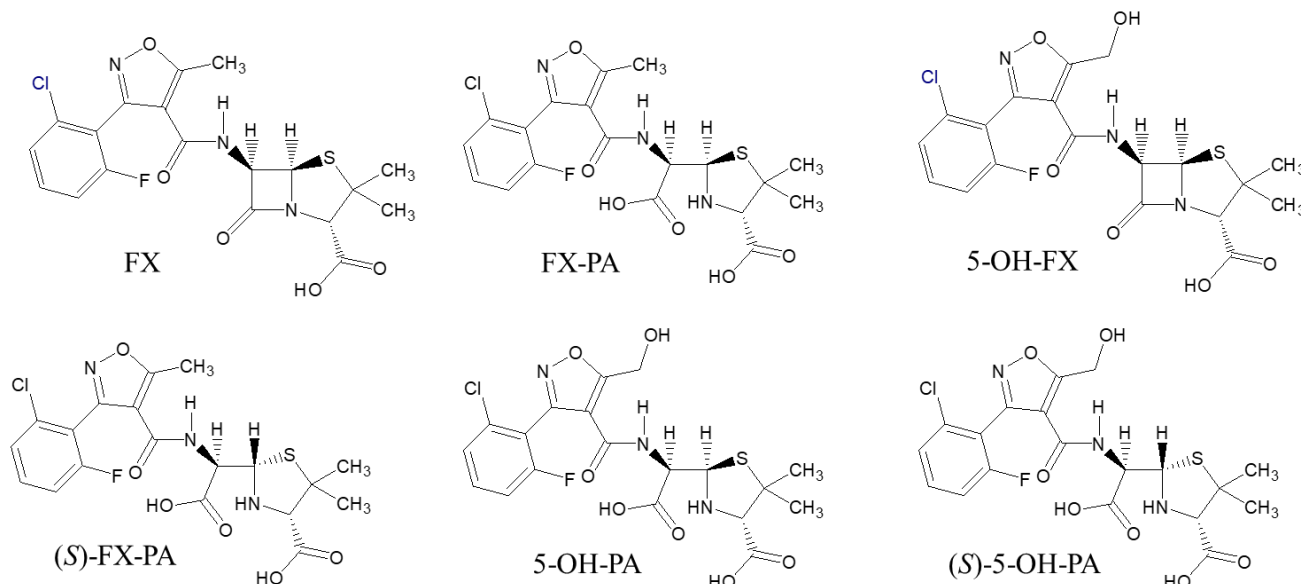
一般に、医薬分子は体内で代謝され、多くの代謝化合物が生成するので、それらの代謝化合物が医薬分子の副作用発現に関わることも否定できない。これまでの研究は、FX が生体内で主に 4 種の代謝産物に変換することを示している [4]。これらの化合物は、5'-hydroxymethyl flucloxacillin (5-OH-FX)、(5R)-flucloxacillin penicilloic acid (FX-PA)、(5S)-flucloxacillin penicilloic acid ((S)-FX-PA) および

5'-hydroxymethyl-(5*R*)-flucloxacillin penicilloic acid (5-OH-PA)である。5-OH-PAのエピマーは代謝産物として確認されていない。(S)-FX-PAのヒドロキシル化は起こる可能性があるため、(S)-5-OH-PAが代謝産物として生成する可能性はある。FXを含めたこれら6化合物の化学構造を図1に示す。

我々はこれら6化合物が *HLA-B*57:01* とどのよう

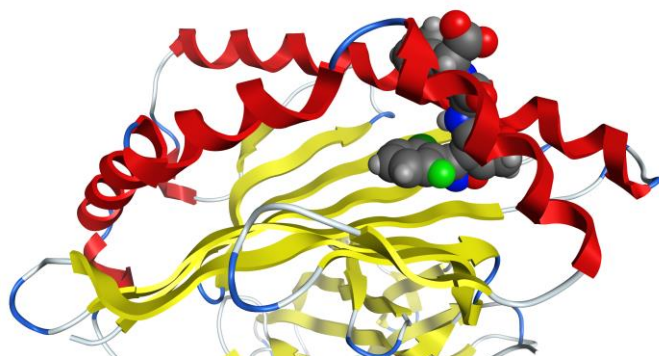
突き出している。特に右上にあるカルボキシ基が大きく分子表面に露出している。従って、5-OH-FXはABCの場合のように、医薬分子が抗原ペプチド結合溝の深い位置に結合し、その上に新たな抗原ペプチドが結合するのではなく、結合した分子がT細胞受容体(T cell receptor : TCR)に直接相互作用して免疫反応が引き起こされる可能性が示唆される。

図1.FXおよびその代謝産物の化学構造



な相互作用をするかについてドッキング・シミュレーションを用いて解析した[5]。その結果、これらの化合物はすべて *HLA-B*57:01* の抗原ペプチド結合溝の同じ場所に結合し、かつ分子表面に近いところに結合する可能性が高いことが示された。IDT発現に最も関係のある代謝産物として報告されている5-OH-FX [6]が *HLA-B*57:01* に結合する様子を図2に示す。この図で *HLA-B*57:01* はcartoon表示し、5-OH-FXはspace-filling表示している。

図2. 5-OH-FXと *HLA-B*57:01* の相互作用



5-OH-FXはHLAの抗原ペプチド結合溝からかなり

本研究の目的は、*HLA-B*57:01* に結合したFXとその代謝産物5種類がTCRとどのように相互作用でき得るかを分子力学計算で求め、FXによるIDT発症の分子メカニズムをさらに解明することである。以下、FX関連化合物、*HLA-B*57:01* およびTCRの複合体構造を簡単のためにFX/HLA/TCRのように表記する。

2. 結果の概要

以下の全ての計算は統合化学計算システムMOE[7]を用いて行った。

2-1) 化合物/HLA/TCR複合体モデルの構造

現在、Protein Data Bank[8]に供託されている抗原ペプチド/HLA/TCRX複合体結晶構造のうち、*B*57:01* とのアミノ酸配列の一致度が高いHLAに *B*35:01* がある。アミノ酸の一致度は90.7% (UIDが1-182の $\alpha 1$ および $\alpha 2$ 領域)であり、*B*35:01*は本研究に必要なモデル構築を行う上で十分な相同性を有すると判断した。

ペプチド/*HLA-B*35:01*/TCR複合体の結晶構造は4種類(PDB ID : 2NX5, 3MV7, 3MV8および3MV9)が報告されているが、もっとも分解能の高い回折データに

基づいて精密化された 3MV7 構造に基づいて、化合物/HLA/TCR 複合体モデルを構築した。初期モデル構造は、*B*57:01* および *B*35:01* の HLA 分子内で抗原ペプチド結合部位を構成する 2 本の α -ヘリックス部分 (UID が 50-86 および 138-180 のアミノ酸残基領域) の主鎖構造を重ね合わせるにより構築した。対応する 2 本のヘリックス部分の主鎖重原子の二乗平均平方根偏差は 0.64 Å であり、抗原ペプチド結合部位を形成する部分の構造が両構造で十分に類似しており、以下の議論を行う上で十分良好な複合体モデルであると判断した。化合物/HLA 複合体の構造は、すでにドッキング計算で求めた構造[5]を用いた。

3MV7 構造では、*HLA-B*35:01* に結合した Epstein-Barr ウイルス由来のペプチドを CTL クローンの一つである TK3 が認識し、相互作用している。*HLA-B*57:01* に結合した抗原化合物が TK3 によっても認識されるという前提に基づき、化合物/*HLA-B*57:01*/TK3 TCR 複合体モデルの構造最適化を分子力場法で行った。MMFF94x 力場[9]および Born 近似溶媒モデル[10]を用い、誘電率 1 の条件で、エネルギー勾配が 0.01 kcal mol⁻¹ Å⁻¹ になるまで構造最適化した。その際、主鎖重原子以外の全原子を可動にして、誘導適合の効果を考慮した。

表 1 に最適化した構造の GBVI/WSA_dG[11]を示す。GBVI/WSA_dG は結合による自由エネルギー変化を近似する値であり、負の絶対値が大きいくほど、結合性が強いことを示す。(S)-5-OH-PA はこれまで代謝産物として観測されていない。最も体内での生成が多いとされる 5-OH-FX の結合性が最も高いのは興味深い。親化合物である FX の結合性は最も低く、IDT への関与は代謝産物に大きく依存することをこの計算結果は示唆する。

2-2) TCR との相互作用

IDT 発現に最も関係のある代謝産物として報告さ

表 1. 化合物/HLA/TCR 複合体の結合性

複合体	GBVI/WSA_dG (Kcal/mol)
(S)-5-OH-PA	-9.69
5-OH-FX	-9.57
FX-PA	-9.55
(S)-FX-PA	-9.26
5-OH-PA	-9.17
FX	-8.45

れている 5-OH-FX と *HLA-B*57:01* および TK3 TCR との複合体構造を図 3 に示す。この図の下部分は、5-OH-FX と *HLA-B*57:01* の複合体であり、図 2 と同じ方向から見ている。上の β -シート部分が TCR である。この図は交差法で描いたステレオグラムである。

既に述べたように、5-OH-FX は *HLA-B*57:01* の分子表面部分に結合し、そのカルボキシル基の酸素原子 (図中では赤い球で示す) の 1 つと TCR(TK3)の β 領域にある Arg109 のグアニジノ基が水素結合する。

5-OH-FX/*HLA-B*57:01*/TCR(TK3)複合体を形成したことにより、TCR 残基 Arg109 の側鎖構造は 3MV7 構造における元の位置から、5-OH-FX 側に動いている (側鎖重原子の RMSD は 1.00 Å)。このように、5-OH-FX のカルボキシル基が抗原ペプチドの側鎖構造を代替する形で TCR(TK3)と結合する可能性が考えられることから判断して、5-OH-FX が *HLA-B*57:01* に結合した上に新たな抗原ペプチドが結合するのではなく、図 3 に示すように *HLA-B*57:01* に結合した 5-OH-FX が直接的に対応する TCR と相互作用すると考えるほうが妥当である。

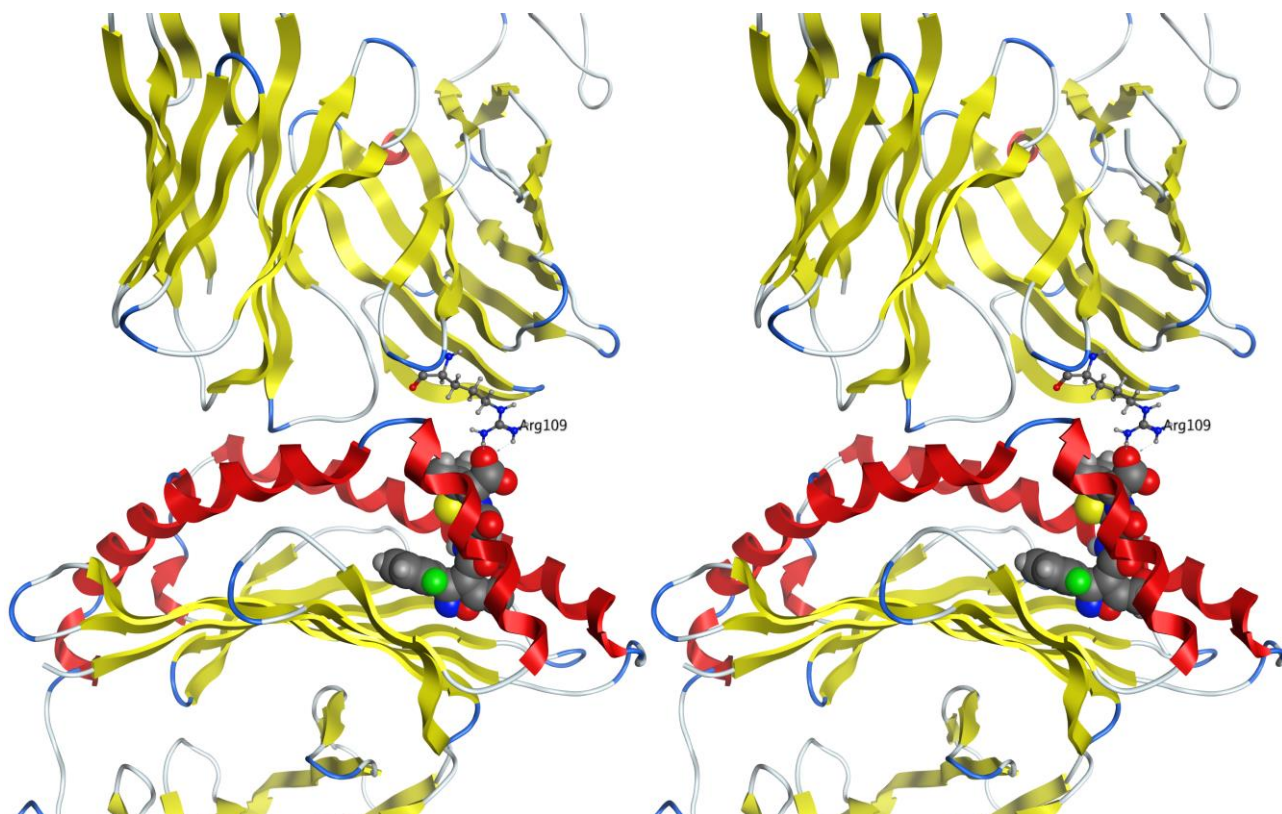
3. 考察

本研究では、FX およびその代謝産物 (推定代謝産物も含む) と *HLA-B*57:01* との複合体が TCR とどのように相互作用するかを分子力学計算により推定した。

実際に代謝産物として観測されて化合物の中で、FX 投与後の体内で最も濃度が向上し、FX の IDT 発症との関係が最も重要と考えられてきた 5-OH-FX が最も TCR との相互作用が強いことが本研究で明らかになり、多くの患者での FX による IDT は 5-OH-FX によることが確認された。また、5-OH-FX のカルボキシル基が直接的に TCR と相互作用できるため、抗原ペプチドの介在がこの IDT には不要であることが示唆された。

Maier-Salamon1 ら[6]は、FX 投与後の血漿中の代謝産物を測定し、多くの患者では、FX の投与後 40 時間後に、5-OH-FX および 5-OH-PA の濃度が有意に上昇することを確認している。これに対して FX と FX-PA の濃度は上昇しない。しかし、興味深いことに特定の少数患者においては、FX-PA が主たる代謝産物であることも確認している。表 1 に示すように、FX-PA の結合性は本来的に FX より高いことから、それらの患者においては、FX-PA への変換が何らかの理由で亢進してい

図3. 5-OH-FX と *HLA-B*57:01* および TK3 TCR との複合体構造 (ステレオ図)



る可能性もある。

さらに、これまで代謝産物として全く報告がなかった(S)-5-OH-PA は TCR との親和性が最も強い予想されたことから、この化合物への変換が体内で起こり得る体質を持った患者群においては、より重篤な IDT の発現が予想され、特定の患者群における深刻な IDT を考える上で重要な化合物である可能性が示唆された。

4.引用文献

- [1] K.Wing *et al.*, *J. Antimicrob. Chemother.*, **72**, 2636 (2017).
- [2] A.K.Daly *et al.*, *Nat. Genet.*, **41**, 816(2009).
- [3] P.T.Illing *et al.*, *Nature*, **486**, 554(2012)
- [4] H.C.Keun *et al.*, *Anal Chem.*, **80**, 1073 (2008).
- [5] H.Isogai *et al.*, *Chem-Bio Inform.J.*, **19**, 1(2019).
- [6] A.Maier-Salamon1 *et al.*, *Int. J.Clin. Pharmacol. Ther.*, **55**, 701(2017).
- [7] MOE(molecular Operating Environment), 2014.09: Chemical Computing Group: Montreal, Canada, (2014)
- [8] F.C.Bernstein *et al.*, *J.Mol.Biol.*, **112**, 535(1977)
- [9] T.A.Halgren, *J. Comput. Chem.*, **20**, 720(1999)
- [10] M. Wojciechowski *et al.*, *J. Phys. Chem.*, **B108**,

18368(2004)

Bulletin of the Institute of Advanced Biosciences, Vol.3, March 2019

- [11] C.R.Corbeil *et al.*, *J.Comput.-Aided Mol.Des.*, **26**, 775 (2012)

5.その他の業績

【論文発表】

- (1) M.Hirasawa *et al.*, “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**, 1660 (2018)
- (2) K.Suyama *et al.*, “Effects of interleukin-17A in nucleus pulposus cells and its small-molecule inhibitors for intervertebral disc disease,” *J.Cell Mol.Med.*, **22**, 5539 (2018)
- (3) H.Isogai *et al.*, “In silico analysis of interactions of flucloxacillin and its metabolites with *HLA-B*57:01*,” *Chem-Bio. Inform.J.*, **19**, 1(2019)