

HLA 多型の関わる接触性皮膚炎リスク評価系の基盤構築 についての研究

千葉大学大学院薬学研究院

伊藤 晃成

Allergic contact dermatitis (ACD) induced by cosmetic ingredients varies among individuals, and human leukocyte antigen (HLA) polymorphisms have been implicated in this variability. In the pharmaceutical field, HLA polymorphisms are well known to influence drug hypersensitivity, with HLA-B*57:01 playing a crucial role in abacavir-induced hypersensitivity reactions. Abacavir binds directly to the peptide-binding groove of HLA-B*57:01, altering the peptide repertoire and triggering T-cell activation. Similarly, some cosmetic ingredients have been suggested to interact with HLA-B*57:01, but their ability to induce immune activation through the same mechanism remains unclear.

Our previous studies demonstrated that exposure to abacavir induces HLA-B*57:01-dependent endoplasmic reticulum (ER) stress responses in keratinocytes, suggesting that ER stress may contribute to skin rash development. To understand the mechanism of HLA-mediated drug-induced hypersensitivity, it is critical to identify the stress factors that trigger ER stress in response to abacavir exposure. Misfolded proteins and aggregates accumulate in the ER, leading to the dissociation of the molecular chaperone BiP from stress sensors such as IRE1 and ATF6, activating the unfolded protein response (UPR).

This study aims to analyze the intracellular localization of HLA-B*57:01 in keratinocytes exposed to abacavir, its interaction with BiP, and the role of ER stress in immune activation. The findings could provide insights into HLA-associated immune activation and contribute to the development of novel risk assessment methods for ACD caused by cosmetic ingredients. By understanding how HLA-B*57:01 interacts with specific compounds, this research may facilitate the establishment of personalized safety evaluation strategies, ultimately improving consumer protection against immune-mediated adverse reactions.

1. 緒言

化粧品成分による接触性皮膚炎には個人差があり、その一因としてヒト白血球抗原 (HLA) 多型の関与が示唆されている¹⁾。医薬品分野では、HLA 多型と薬物過敏症の関連が広く研究されており、特に HLA-B*57:01 は抗 HIV 薬アバカビルによる過敏症発症に重要な役割を果たすことが明らかになっている²⁾。アバカビルは HLA-B*57:01 のペプチド提示溝に直接結合し、提示されるペプチドの種類を変えることで T 細胞を活性化すると考えられている³⁾。一方、化粧品成分についても、in silico ならびに in vitro の実験から HLA-B*57:01 との相互作用が示唆されているものがあるが⁴⁾、これらがアバカビルと同様の機序で HLA-B*57:01 を介した免疫活性化を引き起こすかは不明である。

我々のこれまでの研究により、アバカビルを曝露したケラチノサイトでは HLA-B*57:01 依存的な小胞体ストレス応答が認められており、小胞体ストレスが皮膚発症に関与する可能性が示唆されている。HLA を介した薬疹発症の機序を解明するには、HLA-B*57:01 依存的にアバカビル

が誘導する小胞体ストレスのストレッサーとなる因子を特定することが重要である。一般に、小胞体ストレスはタンパク質のミスフォールディングや凝集によって引き起こされる。小胞体内にミスフォールドタンパク質が蓄積すると、免疫グロブリン重鎖結合タンパク質 (BiP) は小胞体ストレスセンサーである Inositol Requiring 1 (IRE1) や Activating Transcription Factor 6 (ATF6) から解離し、ミスフォールドタンパク質に結合する。BiP が解離すると、IRE1 はリン酸化されて転写因子 XBP1 を活性化し、ATF6 はゴルジ体へ移行して切断され、N 末端の断片が転写因子として核へ移行することで小胞体ストレス応答が惹起される。

アバカビル過敏症の発症機序は、HLA 上のペプチドレパートリー変化を T 細胞が異物として認識することで説明されてきた。一方で、HLA-B*57:01 に加え、タンパク質のフォールディングやペプチドの搭載をサポートする Heat Shock Protein (HSP) 70-Hom や Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase (ERAP) 1 の遺伝子多型もアバカビル過敏症に関連することが、ゲノムワイド関連解析で示されている。これらの知見から、HLA 複合体の形成やフォールディングに関与する細胞内因子が、アバカビル過敏症の発症に影響を与えている可能性が示唆される。実際に我々は、HLA-B*57:01 を発現した細胞にアバカビルを曝露すると、 β_2 microglobulin (β_2m) やペプチドと適切な三量体を形成していない異常な構造の HLA が増加することを確認している⁵⁾。これにより、アバカビルが HLA 複合体の細胞内組み立て過程に影響を与えている可能性が示



Establishment of a Foundational Risk Assessment Model for HLA-Associated Allergic Contact Dermatitis

Kousei Ito

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

唆される。

HLA-B*57:01 の細胞内挙動に注目することは、アバカビル過敏症の発症機序の理解だけでなく、HLA を介した免疫系の活性化に関する新たな知見をもたらす可能性がある。また、化粧品成分による接触性皮膚炎の発症機序の解明にも寄与すると考えられる。特に、化粧品成分が HLA-B*57:01 を介してどのように免疫活性化を引き起こすかを明らかにすることで、HLA 多型を考慮した新たな評価法の開発につながる可能性がある。

本研究では、HLA-B*57:01 を発現するケラチノサイトにアバカビルを曝露した際の HLA の細胞内局在、HLA と BiP の結合、および細胞内でのアバカビルと HLA の相互作用について解析し、小胞体ストレスが生じる機序を探索することを目的とした。

2. 方 法

2. 1. 初代ケラチノサイトの単離と各種化合物曝露時の HLA と BiP の結合変化評価

生後 1 - 2 日の B*57:01 あるいは B*57:03 多型導入マウスから皮膚組織を回収し、抗生物質と 5mg/mL dispase (Wako Pure Chemical; Osaka, Japan) 入りの CnT-PR 培地 (CELLnTEC ; Bern, Switzerland) 中で 4℃ で 15-18 時間インキュベーションした。真皮と表皮を分離して表皮のみを回収した後、accutase を用いて表皮からケラチノサイトを単離した。ケラチノサイトを抗生物質入り CnT-PR 培地に懸濁し、コラーゲンコートした 12 ウェルプレート (Greiner Bio-One, GmbH, Germany) に 3×10^5 cells/well で播種した。12-16 時間後に培地交換を行い、培養 6 日目に CnT-PR に溶解したアバカビル 100 μ M を曝露した。細胞を可溶化して HLA を Flag タグで免疫沈降し、共沈した BiP をウェスタンブロットで検出した。

2. 2. 免疫染色

細胞を 4%PFA で固定 (4℃, 15 分間) した。続いて、0.01% Triton X-100/PBS で透過処理 (4℃, 15 分間) し、1% BSA/PBS でブロッキング (室温, 30 分間) した。マウス抗 FLAG mAb およびウサギ抗カルネキシン pAb と反応 (室温, 1 時間; 1% BSA/PBS で希釈) させ、続いて Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体および Alexa Fluor 546 標識抗ウサギ IgG 抗体と反応 (室温, 1 時間; 1% BSA/PBS で希釈) させた。RNaseA を加えて細胞内 RNA を消化し、TO-PRO-3 を加えて核を染色し、Fluorescent Mounting Medium で封入した。染色した細胞は、共焦点レーザー顕微鏡 Zeiss LSM 700 (Airyscan および ZEN ソフトウェアを搭載; Carl Zeiss 社製) を用いて観察した。

3. 結 果

3. 1. アバカビル曝露時の HLA の細胞内局在の変化の評価

アバカビルが HLA の細胞内局在に与える影響を評価した結果、B*57:01-KC においてアバカビル曝露後に HLA の細胞内凝集体が顕著に観察された (図 1a, b)。一方、B*57:03-KC では、アバカビル曝露の有無にかかわらず HLA の細胞内凝集体の形成はほとんど認められなかった (図 1a, b)。さらに、アバカビル曝露による HLA-B*57:01 の細胞内凝集体の形成は、4-フェニル酪酸による前処理によって抑制された (図 1a)。

また、HLA などの糖鎖付加を阻害し、小胞体内でミスフォールドタンパク質の発現を促進するツニカマイシンを曝露すると、HLA の多型に依存せずケラチノサイトで HLA の細胞内凝集体が形成されることも確認している (data not shown)。この結果は、HLA の細胞内凝集体が、小胞体内でのミスフォールドに起因する可能性を示唆している。

次に、細胞内の HLA-B*57:01 の局在を解析したところ、小胞体内の分子シャペロンであるカルネキシンおよび BiP と共局在していることが確認され、HLA-B*57:01 が主に小胞体に局在することが示唆された (図 1c, d)。しかし、HLA の細胞内凝集体の多くはカルネキシンや BiP とは共局在していなかった (図 1c, d)。HLA は通常、重鎖と β_2 m が会合した複合体を形成することから、HLA の凝集体に β_2 m が含まれるか調べた。その結果、HLA-B*57:01 重鎖の多くは β_2 m と共局在した一方で、凝集体部分には β_2 m の染色がほとんど認められなかった (図 1e)。さらに、アバカビル曝露後の B*57:01-KC では、ATF6 の細胞内凝集体が観察され、この凝集体が HLA-B*57:01 と共局在することも確認された (図 1f)。

3. 2. アバカビル曝露時の HLA のミスフォールディングの評価

細胞可溶化液中の HLA を免疫沈降したところ、アバカビル曝露を受けた B*57:01-KC では、コントロールと比較して BiP の結合量が増加していた (図 1g)。BiP は小胞体内のミスフォールドタンパクと結合する分子シャペロンであることから^{6,7)}、この結果は、アバカビル曝露により HLA-B*57:01 が小胞体内でミスフォールドした可能性を示唆している。一方、B*57:03-KC では、アバカビル曝露後も HLA と BiP の結合亢進は認められなかった (図 1g)。同様の実験を HLA-Tg マウス由来の肝細胞に対して行った結果、B*57:01-Tg 由来の肝細胞では、アバカビル曝露による HLA と BiP の結合亢進は観察されなかった (data not shown)。

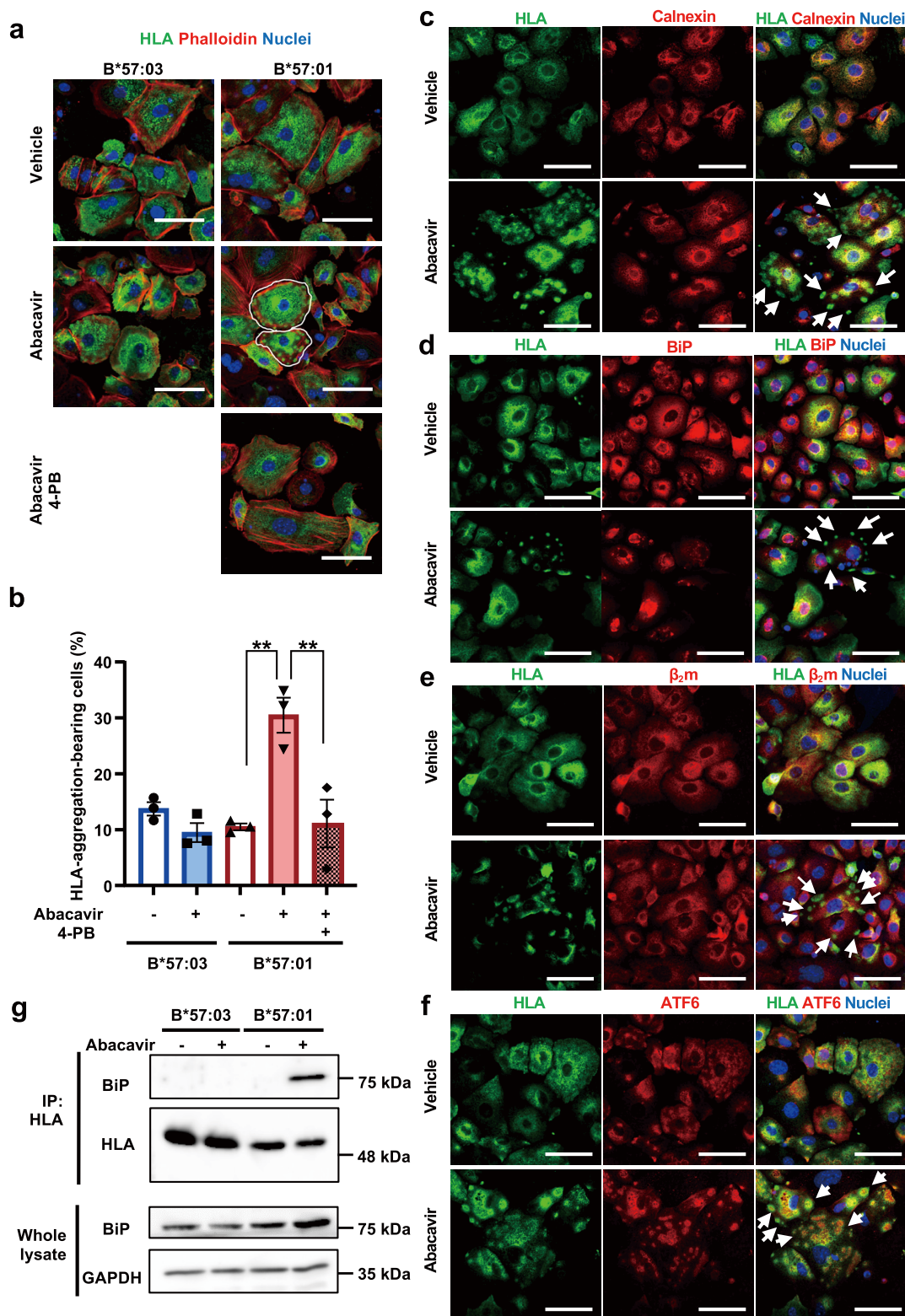


図1 アバカビルはセラチノサイトにおいてHLA-B*57:01のミスフォールディングと凝集を誘導する

(a) HLA-B*57:01 多型導入マウス由来のセラチノサイト (B*57:01-KC) およびHLA-B*57:03 多型導入マウス由来のセラチノサイト (B*57:03-KC) をアバカビル (100 μ M) の有無で30分間処理した後に固定し、HLAをFLAGタグで検出した。スケールバーは50 μ m。

(b) 各実験で210～396個の細胞を観察し、図a中の白線で示すような凝集を示す細胞を計数した。c, d, e, f) B*57:01-KCにおけるHLAと各種タンパク質の共染色。a) と同様の条件で細胞を処理したのち、抗カルネキシン (c)、抗BiP (d)、抗 β_2m (e)、または抗ATF6 (f) 抗体で染色した。さらに、抗FLAG抗体およびTO-PRO-3で染色した。矢印はFLAGタグ付きタンパク質 (HLAに相当) の凝集体を示している。スケールバーは50 μ m。g) B*57:03-KCおよびB*57:01-KCにアバカビル (100 μ M) 有無で30分間曝露した後に細胞を可溶化し、抗FLAG抗体でHLAを回収した後に抗BiP抗体および抗FLAG抗体で検出した。GAPDHはローディングコントロール。

4. 考 察

ケラチノサイトにおいて、HLA 多型依存的にアバカビルが小胞体ストレス応答を誘導することが明らかとなった。小胞体ストレスは通常、タンパク質のミスフォールディングや凝集によって引き起こされる⁸⁾。アバカビル曝露後、一部の HLA-B*57:01 が細胞内で凝集体を形成し、それらには β_2m が共局在していないことが確認された。この結果は、正常な HLA 複合体の形成が阻害されていることを示唆している。さらに、ATF6 の染色結果から、 β_2m と会合していない HLA が ATF6 を巻き込んで凝集した可能性も考えられる。免疫沈降の結果、HLA-B*57:01 と BiP の結合が亢進しており、小胞体内での HLA のミスフォールディングが小胞体ストレスの一因となっていることが示された。また、アバカビル存在下では、HLA が ATF6 とともに小胞体から出芽し、細胞内で凝集体を形成することが示唆された。小胞体から出芽した ATF6 が細胞内で凝集すると、ATF6 シグナル伝達が阻害され、小胞体ストレスがさらに亢進する可能性がある^{9, 10)}。しかし、この凝集体の形成メカニズムは未解明の部分が多く、詳細な解析が今後の課題となる。

HLA の成熟過程に直接的または間接的に関与する遺伝的背景が薬疹の発症に関連することが報告されている。HSP70 およびプロテアソームサブユニットの変異は、薬物誘発性 Stevens-Johnson 症候群/中毒性表皮壊死症 (SJS/TEN) の発症と関連し^{11, 12)}、分子シャペロン HSP70-Hom の変異はアバカビル過敏症と関係する¹³⁾。また、HLA に搭載される抗原ペプチドの最終プロセシング酵素である ERAP1 の遺伝子変異は HLA-B*57:01 保因者におけるアバカビル過敏症と¹⁴⁾、ERAP2 の遺伝子変異は HLA-C*04:01 保因者におけるネビラピン誘発性 SJS/TEN と¹⁵⁾ 関連している。これらの遺伝子は HLA 複合体の安定性に関与し、その変異が薬剤誘発性のミスフォールディングを引き起こし、小胞体ストレスの亢進に寄与する可能性が指摘されている¹⁶⁻¹⁹⁾。

我々は、薬物過敏症に関連する HLA 多型では HLA 重鎖と β_2m の親和性が低く、小胞体内に蓄積しやすいことを報告している⁵⁾。これは、小胞体内での HLA のミスフォールディングや薬物による小胞体ストレス応答が薬疹の発症に関与する可能性を示唆している。HLA 複合体の安定性に影響を与える因子を明らかにすることは、HLA を介した薬物誘発性小胞体ストレス応答の解明のみならず、毒性の個人差、細胞種間の違い、組織間の特性を理解する上でも重要である。

アバカビル曝露による HLA-B*57:01 の凝集体形成や BiP との結合量の変化は、HLA を発現する細胞の由来組織によって異なる可能性も示唆されている。具体的には、ケ

ラチノサイトでは HLA-B*57:01 と BiP の結合はアバカビル曝露により亢進したが (図 1g)、同じく B*57:01 多型導入マウスから単離した初代肝細胞ではそのような変化は認められなかった (data not shown)。HLA の凝集体形成に組織差が生じる機序は現時点で不明だが、小胞体での成熟速度の違いが関与する可能性が考えられる。HLA 複合体の組み立てと構造安定性は、Transporter Associated with Antigen Processing (TAP) 1、Tapasin、TAP-Binding Protein-Related (TAPBPR) などの Peptide Loading Complex (PLC) を構成するタンパク質に依存している。PLC を構成するタンパク質の発現レベルは組織や細胞種ごとに異なり、例えば、Tapasin、TAPBPR、ERAP1 を含むタンパク質の発現量は、肝細胞に比べてケラチノサイトでは低いことが示唆されている (Human Protein Atlas, <https://www.proteinatlas.org/>)。この発現の違いが HLA 複合体の組み立てに影響を与えている可能性がある。

アバカビルのように HLA のペプチド結合溝にはまり込み、HLA と強く結合する化合物の報告は限られている。Schutte らは、皮膚刺激性が知られる 22 種類の化粧品成分を対象に、各種 HLA 多型とのドッキングシミュレーションを実施し、安息香酸ベンジル、サリチル酸ベンジル、桂皮酸ベンジルが HLA-B*57:01 と結合する可能性を見出した⁴⁾。さらに、これら 3 化合物について HLA-B*57:01 保有者の末梢血単核球を用いた T 細胞活性化試験を行い、サリチル酸ベンジルがリンパ球の増殖やサイトカイン産生を亢進させることが確認されている。しかし、これらの化合物がアバカビルと同様に HLA-B*57:01 に直接結合し、提示ペプチドを変化させるのか、また、本研究で観察されたような小胞体ストレス応答を引き起こすのかについては明らかではなく、今後の検討が必要である。

5. 総 括

HLA-B*57:01 依存的なアバカビル曝露による小胞体ストレス応答がケラチノサイトで顕著に観察され、HLA のミスフォールディングと BiP との結合亢進が確認された。本知見を活用することで、HLA 多型に基づく化粧品成分の影響評価が可能となり、安全性評価の高度化に寄与することが期待される。

謝 辞

本研究の一部は、PNAS Nexus, Volume 3, Issue 4, April 2024, pgae140 にて報告した。本研究の遂行に当たり、多大なご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く御礼申し上げます。本研究の実施にあたり多大な貢献をいただいた風岡顯良博士、青木重樹准教授をはじめとする研究室の現役ならびに OB/OG メンバーに深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Sieben S, Hertl M, Al Masaoudi T, Merk HF and Blömeke B: Characterization of T Cell Responses to Fragrances. *Toxicol Appl Pharmacol* 172: 172-178, 2001.
- 2) Mallal S, Nolan D, Witt C, *et al.*: Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir.
- 3) Illing PT, Vivian JP, Dudek NL, *et al.*: Immune self-reactivity triggered by drug-modified HLA-peptide repertoire. *Nature* 486: 554-558, 2012.
- 4) Schutte RJ, Zhang X, An N, Ostrov DA and Vukmanović S: Molecular docking predictions of fragrance binding to human leukocyte antigen molecules. *Contact Dermatitis* 81: 174-183, 2019.
- 5) Shirayanagi T, Kazaoka A, Watanabe K, *et al.*: Weak complex formation of adverse drug reaction-associated HLAB57, B58, and B15 molecules. *Toxicol In Vitro* 82: 105383, 2022.
- 6) Accili D, Kadowaki T, Kadowaki H, Mosthaf L, Ullrich A and Taylor SI: Immunoglobulin heavy chain-binding protein binds to misfolded mutant insulin receptors with mutations in the extracellular domain. *J Biol Chem* 267: 586-590, 1992.
- 7) Hurtley SM, Bole DG, Hoover-Litty H, Helenius A and Copeland CS: Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP). *J Cell Biol* 108: 2117-2126, 1989.
- 8) Hibino M, Sugiura K, Muro Y, Shimoyama Y and Tomita Y: Cyclosporin A induces the unfolded protein response in keratinocytes | *Archives of Dermatological Research*. *Arch Dermatol Res* 303: 481-489, 2011.
- 9) Amodio G, Venditti R, De Matteis MA, Moliterno O, Pignataro P and Remondelli P: Endoplasmic Reticulum stress reduces COPII vesicle formation and modifies Sec23a cycling at ERESs. *FEBS Lett* 587: 3261-3266, 2013.
- 10) Credle JJ, Forcelli PA, Delannoy M, *et al.*: α -Synuclein-mediated inhibition of ATF6 processing into COPII vesicles disrupts UPR signaling in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 76: 112-125, 2015.
- 11) Alfrevic A and Pirmohamed M: Predictive Genetic Testing for Drug-Induced Liver Injury: Considerations of Clinical Utility. *Clin Pharmacol Ther* 92: 376-380, 2012.
- 12) Nicoletti P, Bansal M, Lefebvre C, *et al.*: ABC Transporters and the Proteasome Complex Are Implicated in Susceptibility to Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis across Multiple Drugs. *PLOS ONE* 10: e0131038, 2015.
- 13) Martin AM, Nolan D, Gaudieri S, *et al.*: Predisposition to abacavir hypersensitivity conferred by HLA-B*5701 and a haplotypic Hsp70-Hom variant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4180-4185, 2004.
- 14) Pavlos R, Deshpande P, Chopra A, *et al.*: New genetic predictors for abacavir tolerance in HLA-B*57:01 positive individuals. *Hum Immunol* 81: 300-304, 2020.
- 15) Carr DF, Bourgeois S, Chaponda M, *et al.*: Genome-wide association study of nevirapine hypersensitivity in a sub-Saharan African HIV-infected population. *J Antimicrob Chemother*: dkw545, 2017.
- 16) Hammer GE, Gonzalez F, Champsaur M, Cado D and Shastri N: The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nat Immunol* 7: 103-112, 2006.
- 17) Kim I, Kim JH, Rhee JY, *et al.*: Patient HSP70-hom TG haplotype is associated with decreased transplant-related mortality and improved survival after sibling HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Transplant* 24: 459-466, 2010.
- 18) Tran TM, Gill T, Bennett J, *et al.*: Paradoxical Effects of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 Deficiency on HLA-B27 and Its Role as an Epistatic Modifier in Experimental Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol* 75: 220-231, 2023.
- 19) Vitulano C, Tedeschi V, Paladini F, Sorrentino R and Fiorillo MT: The interplay between HLA-B27 and ERAP1/ERAP2 aminopeptidases: from anti-viral protection to spondyloarthritis. *Clin Exp Immunol* 190: 281-290, 2017.