

論文の内容の要旨

論文題目：創薬における *in vitro* および *in vivo* ターゲットバリデーションに関する研究

氏 名：加藤 稔

近年、創薬の成功確度は低下の一途をたどっており、これは有望な創薬標的の枯渇化に起因していると考えられている。残された機能未知分子の創薬標的（ターゲット）としての妥当性検証（バリデーション）を、迅速かつ効率的に行い、有望な創薬標的を見出すことが新薬の創製において、極めて重要である。さらに近年では、従来の低分子医薬に加え抗体医薬や核酸医薬などの高分子医薬と呼ばれる新たな創薬様式が登場し、これらは生体が本来有している内在性分子が医薬品になるため、毒性や代謝安定性の評価過程を回避でき、開発速度が格段に速く、ターゲットバリデーションもこれに対応すべく迅速性が強く求められている。ターゲットバリデーションは大きく *in vitro* と *in vivo* に分けることができる。*In vitro* ターゲットバリデーションは、組換えタンパク質を用いた試験管内研究や細胞を用いた単純系における機能解析研究などであり、*in vivo* ターゲットバリデーションは動物個体を用いた複雑系における機能解析研究である。本研究ではターゲットバリデーションの迅速化・効率化を目指し、*in vitro* および *in vivo* ターゲットバリデーションの現行の方法の評価、並びに改良法について検討することを目的として行った。

創薬研究において標的候補分子に対する *in vitro* ターゲットバリデーションは、標的分子の基本的な機能及び活性を明らかにする点で極めて重要である。第1章では、肝細胞増殖因子 (HGF)活性化因子1型阻害因子 (HAI-1)とヒト気道トリプシン様プロテアーゼ (HAT)に対して *in vitro* ターゲットバリデーションを行った例を示し、この方法の評価を試みた。HAI-1は2個のKunitzドメインを持つセリンプロテアーゼインヒビターであり、HGF活性化因子の強力な内在性阻害タンパク質として同定された。また、HATは肺上皮細胞に主に発現が認められる膜型セリンプロテアーゼであり、慢性気管支炎患者や喘息患者の喀痰中に多く発現が認められ、

呼吸器疾患治療薬の標的として注目されている。そこで、HAI-1 が HAT のプロテアーゼ活性を阻害し得るかについて、その分子機構とともに検証した。その結果、Kunitz ドメインを1つだけ持つ遊離型の HAI-1 は HAT のプロテアーゼ活性を阻害すること、また膜結合型の HAI-1 は HAT の活性化も阻害することを明らかとした。すなわち、HAT 発現遺伝子を哺乳類細胞に導入すると、活性型 HAT が培養上清中に遊離されることが明らかとなったが、この活性化は HAT 自身のプロテアーゼ活性に依存的であることが HAT 発現遺伝子への点変異導入実験により判明した。これに対し、HAT と膜発現型の全長 HAI-1 を共発現させると、HAT の活性化が阻害されることが明らかとなった。さらに、HAT は他の HAI-1 ターゲットプロテアーゼと同様、HGF 前駆体タンパク質を活性化させることも明らかとなった。これらの結果より、HAT の生理的な活性化機構、内在性インヒビターとしての HAI-1 との関連、および HGF 前駆体タンパク質を活性化させることによる病態形成への寄与の可能性を示唆することができた。本章の研究により、ターゲット分子およびその変異体を自在に発現でき、酵素活性測定などの生化学的検証や培養細胞を用いた遺伝子過剰発現等による生理的機能検証、相互作用分子の同定などが容易な現行の *in vitro* ターゲットバリデーションは、創薬において極めて大きな威力を発揮することを実例をもって示すことが出来た。一方、今回、活性型 HAT は主に培養上清中で検出され、細胞溶解物中ではほとんど検出されなかったが、本研究で用いられた HEK293 細胞は HAI-1, HAT いずれも内在性に発現していないヒト胎児腎臓由来細胞であり、人工的に強制発現させたものである。生体内における標的分子の役割を反映したより精度の高い *in vitro* ターゲットバリデーションへとつなげるためには、標的分子を内在性に発現する細胞を用いる必要があることも示唆された。

In vitro ターゲットバリデーションによって、創薬標的としての魅力が高まった分子に対しては、個体組織における高次機能を明らかとする目的で *in vivo* ターゲットバリデーションが行われる。第2章では、機能未知遺伝子の *in vivo* ターゲットバリデーション手法として標的遺伝子に対するノックダウンを生じさせる RNA interference (RNAi)法に着目し、*in vitro* および *in vivo* での応用を試みた。本章では、ヒト micro RNA の一つである mir-187 前駆体配列を利用した

small interfering RNA (siRNA)発現カセットを用いた、遺伝子発現抑制手法を開発した。標的遺伝子として、摂食および代謝に関連するマウス4型メラノコルチン受容体 (*mMc4r*) 遺伝子を選定し、まず、その配列に対する siRNA を miR-187 配列と置換させた siRNA 発現遺伝子カセット(miR-mMC4R)を構築した。次に、サイトメガロウイルス (CMV) エンハンサー/ ニワトリ β -actin プロモーター (CAG プロモーター) の下流に miR-mMC4R を連結した遺伝子を構築し、哺乳類培養細胞に *mMc4r* を過剰発現させる遺伝子と共導入したところ、約 80%の特異的な遺伝子発現抑制効果を示した。この遺伝子を用い、トランスジェニック (tg)マウスラインを確立したところ、脳各部位において内在性 *mMc4r* mRNA の 20~30%の有意な発現抑制を認めた。また、ノーザンブロット解析により導入した遺伝子由来 *mMc4r* siRNA の発現を確認した。さらに tg マウスは 9%の有意な摂餌量亢進と 30%の体重増加の表現型を有しており、高インスリン血症・膵機能変化・脂肪肝の発症・内臓脂肪の蓄積など、*mMc4r* ノックアウトマウスと同様の表現型が認められた。本ベクターは従来報告されている方法と比較し、制限酵素サイトにより合成されたヘアピンオリゴ DNA を直接的に導入出来る、他のプロモーターベクターへの移植が容易である、tg 動物を迅速に選別できる、といった利点を持つよう改良されている。また、RNAi 発現ベクターを用いた tg 法では、発現量が異なる複数の tg ラインを解析することにより、遺伝子発現量と表現型の相関を検討し得る可能性が示され、ノックアウト技術には無い本方法の利点が示唆された。これらの結果より、mir-187 前駆体配列を利用した siRNA 発現遺伝子カセットの *in vitro* および *in vivo* における遺伝子ノックダウン法が有効である事が証明され、迅速・効率的なターゲットバリデーションに有用であることが示唆された。

標的候補分子の *in vivo* ターゲットバリデーション研究において、遺伝子改変動物は極めて強力なツールである。中でも tg 技術は、げっ歯類だけでなく家畜や霊長類においても作成実績があり、遺伝子機能解析や疾患モデル動物の開発研究において極めて重要な技術である。しかしながら、その作出効率は限定的であり、研究効率の観点で課題とされている。したがって tg 動物の作成過程において、目的とする動物の作出効率向上は *in vivo* ターゲットバリデーション手法としての有用性を高めるものである。第3章では、緑色蛍光タンパク質 (EGFP)をマーカー

とした、着床前の遺伝子改変胚の選別方法を確立した。CAG プロモーター下流に EGFP を連結させた遺伝子を受精卵前核に顕微注入し、桑実胚から胚盤胞になるまで培養を行った。胚を蛍光顕微鏡で観察し、一部の胚は制限酵素である *Dpn I* と *Bal 31* によって外来性遺伝子を消化してから PCR を行うことで、ゲノムに組み込まれた遺伝子のみを検出し tg 胚の同定を行った。その結果、全体に蛍光が認められた胚は全てが tg 胚と判定されたが、モザイク様に蛍光が認められた胚の半分は non-tg 胚と判定された。この胚を移植して出生させた個体においては、全体に蛍光が認められた胚を移植して出生させた個体では全体の 77% が tg マウスであり、モザイク様に蛍光が認められた胚を移植して出征した個体では 21.4% が tg マウスであった。これらの結果より、EGFP をマーカーとした tg 胚選別法の有用性が確認され、特に蛍光様式を適切に判別することで著しい作出効率の改善が認められることが明らかとなった。Tg 動物を用いた *in vivo* ターゲットバリデーションに本方法を応用することで、従来必要であった tg 動物の選抜作業を効率化することが可能となり、*in vivo* ターゲットバリデーションの迅速化に寄与できることが示唆された。

本研究では、創薬における *in vitro* ターゲットバリデーションの実践、遺伝子改変動物を用いた *in vivo* ターゲットバリデーションの技術開発、さらにその極めて強力なツールである tg 動物の作出効率向上の方法を検討し、その課題を考察した。創薬標的分子が枯渇化している現在において、機能未知のターゲット分子を迅速かつ効果的にバリデーションをするためには、その利点および課題を正確に把握したうえで駆使していく必要がある。今後、本研究をさらに発展させ、*in vitro*、および *in vivo* のターゲットバリデーション研究の課題を克服していくことで、真に治療効果の高いターゲットを同定し、新たな医薬品の創製研究を行うことができるものと期待される。