

## 審査の結果の要旨

氏名 加藤 稔

新たな医薬品の開発において、創薬標的（ターゲット）の妥当性検証（バリデーション）を、効率的に行うことは極めて重要であるが、特に近年、抗体や核酸など、毒性や代謝安定性の評価を回避できる生体の内在性分子を対象とした新たな創薬様式が登場し、開発速度の迅速化に伴い、ターゲットバリデーションも迅速性が強く求められるという現状がある。本論文では以上のようなターゲットバリデーションの迅速化・効率化の必要性を述べた序論に続き、これを目的として *in vitro* および *in vivo* における現行の方法の評価、並びに改良法について 3 つの章にわけて検討している。

第 1 章では、*in vitro* ターゲットバリデーションの実践として、呼吸器疾患治療薬の標的として注目される膜型セリンプロテアーゼであるヒト気道トリプシン様プロテアーゼ (HAT) と、強力なセリンプロテアーゼインヒビターとして同定された肝細胞増殖因子活性化因子 1 型阻害因子 (HAI-1) を哺乳類細胞に導入して行った実例を示し、現行の方法の評価を試みている。その結果、特定の遊離型 HAI-1 が HAT 活性を強力に阻害すること、また膜結合型 HAI-1 は HAT の活性化も阻害すること、さらに、点変異導入実験により HAT の活性化は自身のプロテアーゼ活性に依存することを示し、ターゲット分子やその変異体を自在に発現でき、生化学的検証や生理的機能検証、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の有用性を実例をもって示している。一方、本研究で用いた細胞が HAI-1、HAT のいずれも内在性には発現していないことを指摘し、生体内におけるより精度の高い *in vitro* ターゲットバリデーションのための課題も示唆している。

第 2 章では、ヒト *micro RNA* の一種 *mir-187* 前駆体配列を利用した *small interfering RNA* (*siRNA*) 発現カセットを開発し、*RNA* 干渉法を用いた標的遺伝子の発現抑制による *in vitro* および *in vivo* ターゲットバリデーションを試みている。標的遺伝子には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遺伝子を選定し、それに対する *siRNA* を本カセットを用いて構築している。これを強力な発現プロモーターに連結して、先ず哺乳類培養細胞導入して特異的な遺伝子発現抑制効果を確認し、次いで遺伝子導入(*tg*)マウスラインを作製し、脳各部位で有意な発現抑制を認めた動物では、摂餌量亢進と体重増加、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、遺伝子欠損動物と類似の表現型を示すことを確認している。こ

これらの結果より、今回開発したベクターがヘアピンオリゴ DNA の導入、他のベクターへの移植、tg 動物の選別などの点が改良されていること、今回の発現抑制法を用いた *in vivo* ターゲットバリデーションが、遺伝子発現量と表現型の相関を検討し得るという利点があることを示唆し、本法の迅速・効率的なターゲットバリデーションへの利用の可能性を考察している。

第 3 章では、*in vivo* ターゲットバリデーションの極めて強力なツールである、tg 動物の作出効率を高めるための方策について検討し、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の確立を試みている。強力な発現プロモーター下流に EGFP を連結した遺伝子をマウス胚に注入し、初期発生培養中の胚の発する蛍光の様子と、導入遺伝子のゲノムへの組み込みの関係を調べた結果、全体に蛍光が認められた胚は全てが tg 胚と判定されるが、モザイク様の蛍光を示す胚では半分が tg 胚ではないことを見出した。これらの胚を移植して出生させたところ、前者では 77% が tg マウスであるのに対し、後者では僅かに約 20% が tg マウスであることから、今回の EGFP をマーカーとした tg 胚選別法の有用性を示し、tg 動物を用いた *in vivo* ターゲットバリデーションに著しい作出効率の改善が見られる本方法を応用することで tg 動物の選抜作業を効率化し、迅速化に寄与できることを示唆している。

最後にこれらをまとめ、現行法の評価と改良法について述べた後、創薬におけるターゲットバリデーションの在り方について総合的に考察している。

以上、*in vitro* ターゲットバリデーションの実践、siRNA を用いた *in vivo* ターゲットバリデーションの技術開発、tg 動物の作出効率向上法の検討を行い、その課題を考察した本研究成果は、創薬の分野のみならず、バイオテクノロジーを応用した基礎生物学分野の発展にも役立つと考えられ、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。