

## 審査の結果の要旨

氏名 唐木 文霞

唐木文霞は本学博士課程において、「Pharmacological chaperone 作用を応用した新規 NPC1L1 阻害剤の創製」という研究課題に取り組んだ。

NPC1L1 は小腸および肝臓の細胞膜上に発現する 13 回膜貫通型のタンパク質であり、消化管から食餌由来のコレステロールを吸収する機能を担う。このような機能を有することから NPC1L1 は脂質異常症治療薬の標的として注目され、既にエゼチミブという阻害剤が臨床応用されている。現在、NPC1L1 阻害剤の探索が盛んに行われているが、これらはスクリーニングの時点でエゼチミブとの競合を指標としているため、これとは異なる部位に結合する阻害剤は見出されていない。しかし唐木文霞は、後述する NPC1 に関する知見をもとに、エゼチミブとは異なる部位に結合する NPC1L1 阻害剤の創製を試みた。

NPC1 は NPC1L1 とホモログの関係にあり、NPC1L1 と同様にコレステロールの輸送を担う膜タンパク質である。橋本研究室では過去に、変異 NPC1 の局在異常を修正する pharmacological chaperone の創製研究を行い、この研究の過程で NPC1 の新規ステロール結合部位の発見に至った。また、この第二のステロール結合部位に結合するリガンドが NPC1 の機能を阻害し得るという知見も得た。これらの知見から唐木文霞は、(1) NPC1L1 にも NPC1 と同様に第二のステロール結合部位が存在し、ここに結合するリガンドが新たな NPC1L1 阻害剤になり得る (2) 第二のステロール結合部位に対する結合は、pharmacological chaperone 作用による局在変化を利用することで検出できる という仮説を構築し、本研究に着手した。

Pharmacological chaperone 作用による局在変化をスクリーニングに用いるためには、適切な NPC1L1 変異体が必要であった。そこで、NPC1 の変異 (I1061T, Ile → Thr) を参考に変異体のスクリーニングを行い、NPC1L1<sup>L1072T/L1168I</sup> という二重変異体を得た。この変異体は、化合物処理なしでは小胞体局在を示すが、25-hydroxycholesterol (25HC) 等の適切な化合物で処理することにより本来の細胞膜へと局在が修正される (Fig. 1, 上段)。この局在変化を利用してステロール誘導体に関する構造活性相関研究を行い、25HC の側鎖部分をアミドに変換した OG828 が 25HC よりも高活性であること、および OG828 の 3 位水酸基をカルバメート化した FK085 が OG828 よりさらに高活性であることを見出した (Fig. 1 下段)。

次に、FK085 の結合部位に関する知見を得ることを試みた。NPC1L1 のステロール結合部位は、N 末端ドメインと呼ばれる部分であることが示されていた。しかし、唐木文霞はこの部分を欠失させた変異体においても、pharmacological chaperone 作用による局在修正が見られることを明らかに

し、FK085 の結合部位が N 末端ドメインとは異なることを示唆した。また、エゼチミブは NPC1L1 の loop 2 と呼ばれる部分に結合するが、FK085 による pharmacological chaperone 作用とは競合しなかった。このことから、FK085 の結合部位がエゼチミブの結合部位とは異なることも示唆される。すなわちこの研究で得た新規 NPC1L1 リガンドは、従来の NPC1L1 リガンドの結合部位とは全く異なる部位に結合する可能性が高いということである。

得られた NPC1L1 リガンドが有するコレステロール吸収阻害作用を、東京大学医学部附属病院薬剤部との共同研究により評価した。その結果、FK085 は Caco-2 細胞を用いた *in vitro* の系およびマウスを用いた *in vivo* の系の両方において、コレステロールの吸収を阻害した。この結果は、「第二のステロール結合部位を標的としたリガンドが、NPC1L1 の阻害する」という仮説を裏付けるものである。

以上で述べたのは、ステロイド骨格を有する化合物に関して得られた結果である。しかし唐木文霞は、LXR (Liver X receptor) が NPC1L1 と同様にオキシステロールを認識することに着目し、非ステロイド性 NPC1L1 リガンドの創製にも着手した。

本研究では、従来知られていたステロール結合部位および既知の阻害剤の結合部位とは異なる、第二のステロール結合部位に結合する NPC1L1 リガンドの創製に初めて成功した。また、この部分に結合するリガンドが NPC1L1 によるコレステロール吸収を阻害し得ることを示し、「NPC1L1 の第二のステロール結合部位を標的としたコレステロール吸収阻害剤」という新規クラスの脂質異常症治療薬を創出できる可能性を提示した。Pharmacological chaperone 作用による局在変化をリガンドスクリーニングに応用した例はこれまでになく、この点でも今後の創薬に貢献する可能性があると考えられる。よってこれらの成果は、博士（薬学）の学位授与に値すると判断した。

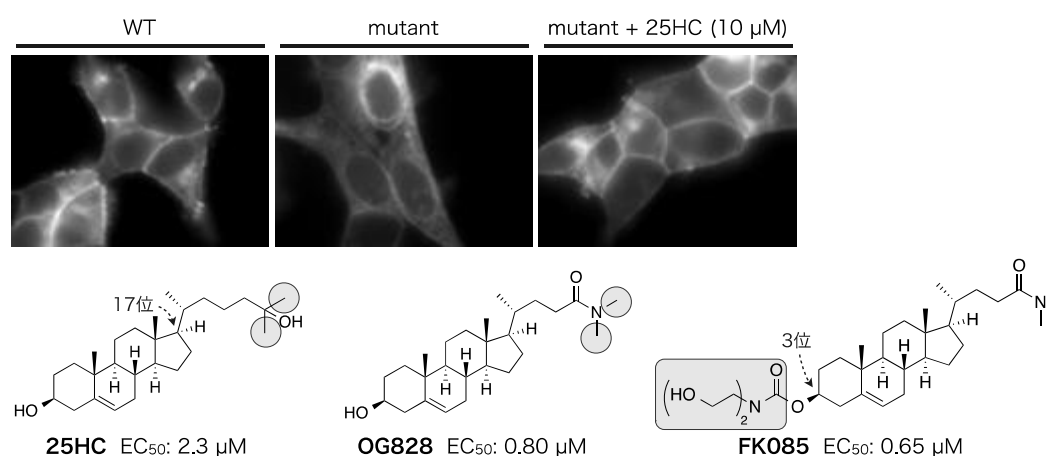


Fig. 1 (上) NPC1L1-GFP を発現させた細胞の蛍光顕微鏡画像. (下) ステロール誘導体の構造式.