

氏名（本籍）	河本 朋広		
学位の種類	博 士（ 生物科学 ）		
学位記番号	博 甲 第	7328	号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	The Molecular Mechanisms of Action of Two Drug Candidates for the Treatment of Myocardial Infarction and Sepsis (心筋梗塞および敗血症治療候補薬の分子作用機構)		
主査	筑波大学准教授	博士（理学）	桑山 秀一
副査	筑波大学教授	理学博士	古久保・徳永克男
副査	筑波大学教授	医学博士	中谷 敬
副査	筑波大学准教授	博士（農学）	臼井 健郎

論 文 の 要 旨

医薬品探索のアプローチは、受容体や酵素などの標的分子に作用する化合物を探索する方法と個体や細胞のフェノタイプの変化を指標に探索する方法に大別される。前者の方法では探索段階の当初から薬剤の標的分子が明らかではあるが、薬効が期待できる標的分子の創出が課題となる。それに比べ後者は、薬効が最初から認められる化合物を起点として創薬研究を開始できる利点を有する。しかしながら、後者の場合、効果に至るまでの分子機構が不明であるという欠点がある。本博士論文では、フェノタイプアッセイで最適化もしくは見出された急性心筋梗塞治療薬 **T-162559** ならびに敗血症治療薬 **TAK-242** について、それらの分子作用機構を明らかにすることを目的とした。

T-162559 は、**NHE** 阻害薬を目指してラット血小板のアシドーシス後の細胞膨潤抑制作用を指標として見出された低分子化合物である。ラット心筋梗塞モデルにおいて強力な梗塞層進展抑制作用を示すことから、心筋梗塞の治療薬になることが期待された。著者は、本化合物が **NHE1** の阻害剤である可能性が高いと考え、その仮説の立証を試みた。まず、アッセイを可能にする細胞株の樹立を試み、内在性 **NHE** を欠損させた **CHO-K1** 細胞株をプロトン自殺法により作製した。その後、取得した **NHE** 欠損株に **NHE-1,2,3** のそれぞれの発現ベクターを安定導入した細胞株し **NH₄Cl** プレパルス処理を行うことによって誘導したアシドーシスに対して **NHE** 活性に基づく細胞内 **pH** の回復を蛍光指示薬 **BCECF** で測定する評価系を構築した。さらに、**NHE** 以外のイオントランスポーターである **Na⁺:HCO₃⁻ cotransporter (NBC1)**, **Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX1)** の活性測定系を併せて確立し、これらの測定系を用いて、**T-162559** が **NHE1** そのものの直接的かつ選択的な阻害剤であることを明らかにした。以上の結果は、**T-162559** の **NHE1** 阻害作用に基づく心筋梗塞治療の分子作用機構を初めて提示するものであった。

TAK-242 は、マウスマクロファージ細胞株 **RAW264.7** を用いて、リポポリサッカライド (**LPS**) で誘導される一酸化窒素(**NO**)の産生抑制作用を指標として見出された低分子化合物である。本化合物は、敗血症ショックモデルマウスにおいて強力な抑制作用を示した。著者は、本化合物が **LPS** などの菌体成分を認識して炎症を誘導する **TLR** のシグナル阻害剤である可能性が高いと考え、その仮説を検証することにした。まず、マウスマクロファージ細胞株 **RAW264.7** 細胞に各種の **TLR** リガンドを添加し、産生される **NO** を測定する系を構築し **TLR4** リガンドである **LPS** に対して選択的な阻害作用を確認した。さらに、**NF-κB** レポーター

ジーンにより TLR からのシグナル伝達を測定する系の構築により、TAK-242 は TLR4 選択的な阻害作用を示すことを明らかにした。TLR4 のアダプター分子である MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM に対して TAK-242 は阻害作用を示さなかったことから、TAK-242 はアダプター分子の上流に位置する分子である TLR4 に作用する可能性が示唆された。そこで、CD4 の細胞内領域を TLR4 に変換し TAK-242 の TLR4 に作用する領域を限定することを試み、TAK-242 は TLR4 の細胞内領域を標的にするという極めて新しい阻害機構を有する化合物であることを示した。以上の結果は、TAK-242 の TLR4 阻害作用に基づく敗血症治療の分子機構を初めて提示するものであった。

本研究により T-162559、TAK-242 の分子標的がそれぞれ Na⁺/H⁺交換体(NHE1)、Toll 様受容体 (TLR4) であることが明らかになり、それぞれの化合物の分子レベルでの作用機序が解明されたと同時に、これらの化合物が Na⁺/H⁺交換体(NHE1)、Toll 様受容体 (TLR4)の分子機能を解析する優れた阻害剤であることも明らかになった。

審 査 の 要 旨

本学位論文において河本朋広氏は、心筋梗塞の治療薬候補である T-162559 ならびに敗血症の治療薬候補である TAK-242 の標的分子がそれぞれ Na⁺/H⁺交換体(NHE1)、Toll 様受容体 (TLR4)であることを明らかにした。これらの研究成果は、心筋梗塞や敗血症の分子レベルでの研究に重要な知見をもたらすとともに、2つの重大疾病の投薬治療に対して大きく貢献する内容である。今後、これらの分子が Na⁺/H⁺交換体(NHE1)、Toll 様受容体 (TLR4)分子の研究に対する有用度の高いツールとして用いられることが期待される。以上より本論文における研究成果は、学術的にも応用的にも非常に価値の高いものであると判断された。

平成 27 年 2 月 3 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生物科学）の学位を受けるのに十分な資質を有するものとして認める。