

氏名(本籍)	はや た けん し 早 田 憲 司 (東京都)			
学位の種類	博 士 (生物科学)			
学位記番号	博 甲 第 6117 号			
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 23 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	Development of Novel Mechanism-Based Screening Systems That Reflect Biological Processes (生体反応機構を反映させた新規低分子化合物スクリーニング系開発に関する研究)			
主査	筑波大学教授	博士(医学)	千葉 智 樹	
副査	筑波大学教授	学術博士	橋 本 哲 男	
副査	筑波大学教授	理学博士	沼 田 治	
副査	筑波大学教授	博士(理学)	中 田 和 人	

論 文 の 内 容 の 要 旨

近年、新薬上市期間の短縮と開発費の削減を至上命題として、従来のスクリーニング規模をはるかに超える手法として High Throughput Screening : HTS が誕生した。当初、HTS は数百万化合物のスクリーニングをいかに早く評価するかという、スピードと量に力点を置いた Cell free assay が主であったが、Cell free assay では比較的容易に高活性化合物を取得できたものの、実際に細胞を用いた実験や生体内で薬効を示す化合物が少ないという問題点があった。そこで、いかに効率良く実際に生体内で薬効を示す化合物を獲得するかという、質に力点を置いた Cell-based assay に移行し、細胞内カルシウムイメージングやレポーター遺伝子発現などが用いられるようになった。しかし、Cell-based assay も低感度、偽陽性等の問題が新たに浮かび上がった。これらの問題を克服するため、生体内の反応機構に立脚した評価解析系の開発を目指した研究に重点がシフトしている。本研究では、適切な評価解析系が確立しておらず、また生理活性物質が得られていない抗血小板薬と糖尿病薬について、それぞれの評価系を構築した。

(1) フォンビルブランド因子を標的とした抗血小板薬の探索研究

これまで上市されてきた抗血小板薬として、クロピドグレルやシロシタズールなどがあるが、これらは血小板に存在する酵素や受容体を阻害することにより、血小板活性化を抑制するため、生理的な一次止血血栓の形成も抑制してしまう危険性があった。この一次血栓形成の抑制は出血の副作用につながるため新薬の開発が求められていたが、これまでの研究手法では血小板活性化を指標とするものしかなかったため、まず新たな評価解析系の作出することが必要であった。動脈において血栓形成に重要なのは、血管内におけるフォンビルブランド因子(以下 vWF)と血小板受容体 Glycoprotein Ib(以下 GPIb)の相互作用である。vWF は通常 GPIb とは結合しない不活性型であるが、血管が破綻すると血管壁に速やかに結合し、構造変化を起こすことで GPIb との結合能を獲得する。これまでの、vWF と GPIb の結合を評価する実験系では、vWF を構造変化させ、血小板に結合させる抗生物質リストセチンを加える必要があった。しかし、リストセチンは生体内には存在しない因子であり、生体内の vWF と GPIb の結合を反映していない可能性があった。そこで

本章では、vWFの構造変化を模倣する変異体を作成し、リストセチンなしにGPIbとの結合を再現できる評価系を開発した。そして約18万化合物のスクリーニングを行なった結果、D74-3736を選抜した。D74-3736は新規に見出されたイソキノリン誘導体であり、結合試験IC₅₀値が5.6 μM、vWF誘起血小板凝集阻害試験のIC₅₀値が68μMであった。そして、既存の血小板薬のもつ副作用は認められなかったことから、本アッセイ系の有用性が確認され、また今後の誘導体合成研究による高活性化が期待された。

(2) 筋肉細胞を標的とした糖消費促進化合物の探索研究

糖尿病は高血糖値が特徴で、I型およびII型糖尿病に分類される。II型糖尿病は全糖尿病患者の90%を占め、その病態としてインスリンによる血糖維持作用に対する抵抗性が挙げられる。II型糖尿病の各組織における糖消費の低下率は骨格筋が最も大きく、II型糖尿病患者の骨格筋での糖消費量を増加させる治療薬開発が求められるが、現在用いられる薬剤の標的臓器は膵臓や脂肪組織であり、筋肉を標的とした薬剤は存在しない。そこで、筋肉を標的とした新規糖消費解析系に関する研究を開始した。これまでの筋肉組織を標的とした糖尿病研究では、インスリンに対して十分な感受性を示す細胞がなかったため、まずインスリン感受性に優れ、細胞増殖に依存しない糖消費を示す細胞株の樹立を目指した。そしてBalb/c 3T3 A31株から高インスリン感受性を示すA31-IS株を取得した。このA31-IS株は、インスリン受容体(IRβ)、グルコース輸送体4(Glut4)の発現量が高く、また骨格筋特異的な発現を示すといわれているUCP-3も高発現していた。このA31-IS株を用いて、約12000化合物のスクリーニングを実施した結果、強力な糖消費促進活性を示すイミダゾリン誘導体3化合物(DF-4394、DF-4451、DG-5451)を獲得した。これら3化合物は筋分化させたC2C12細胞においても糖消費を促進するだけでなく、短時間のグルコース取り込みも促進した。したがって、A31-ISを用いた新規解析評価系が筋肉細胞を標的とした糖消費解析系のモデルとして有用であることが示された。

以上、有用な低分子化合物を高効率に獲得するには、生体内の反応機構に着目した評価解析系の開発が重要であることが実証された。

審査の結果の要旨

早田氏は、有効な生理活性物質が得られていない分野について、生体内反応機構に着目してユニークなバイオアッセイ系を開発し、複数の有用な低分子化合物を取得することに成功した。これらの成果は、新たな治療薬の開発に貢献したばかりでなく、生体のエネルギー代謝機構の解明に新たな視点を提供し、進展をもたらした。また本成果は、ますます効率化が求められる化合物スクリーニングにおけるバイオアッセイ系の重要性を指摘し、その構築のために重要となる考え方を提示した点で高く評価される。

平成24年1月24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)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。