

氏名	福田 保則		
学位の種類	博 士 (生物科学)		
学位記番号	博 甲 第 9054 号		
学位授与年月日	平成 31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	Studies on Prediction Systems for Revealing Biological Functions of Drug Candidates  (医薬品の生物学的作用の予測手法に関する研究)		
主査	筑波大学教授	博士 (理学)	中田 和人
副査	筑波大学教授	博士 (理学)	和田 洋
副査	筑波大学教授	博士 (医学)	千葉 智樹
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	桑山 秀一

## 論 文 の 要 旨

低分子化合物を中心とする医薬品は疾患によって異常となった酵素活性や受容体（標的分子）の機能を正常化する目的で使用されている。しかしながら、このような医薬品が意図しない生体分子に作用し、それらの分子が制御する細胞内反応を変化させることにより、細胞死を代表とする生物学的作用（細胞毒性）を引き起こすことが大きな問題となっている。このような細胞毒性を予測することができれば、医薬品の安全性確保はもとより、新たな医薬品の開発に極めて有用である。しかし、細胞毒性を引き起こすオフターゲットの候補分子は多数あるため、その中から化合物が作用する分子を同定することは容易ではない。さらに、ヒトの体内で生じる組織特異的な細胞毒性反応を*in vitro*細胞評価系において厳密に再現することは困難である。そこで著者は、1) 網羅的な薬効試験データを活用することによって細胞毒性反応を引き起こすオフターゲットを予測する評価系の開発、ならびに、2) 生体内における化合物の細胞毒性反応を再現するための生体環境を模倣した*in vitro*細胞評価系の開発に関する2つの研究課題を設定し、化合物が引き起こす細胞毒性の早期予測および細胞毒性を発揮する細胞内反応の検出を目指した。

第一の研究課題では、作用標的が既に明らかとなっている約1600の化合物それぞれについて、主要な細胞内シグナル伝達経路を反映する15種類のレポータージーンアッセイと8種類の細胞傷害性アッセイによる評価をクラスタリング解析した。その結果、それぞれの化合物は構造類似性だけではなく、細胞内作用機序に基づく生物学的作用に応じた特徴的なクラスタリングとして分類されることが明らかとなった。この特徴を利用し、作用機序未知の化合物について本アッセイシステムで得られる活性プロファイルから、化合物の作用機序を予測するシステム（**pathway profiling system**）を構築することに成功した。構築した**pathway profiling system**の有用性を検証するために、細胞老化誘導剤の化合物スクリーニングにおいて見出されたWntシグナル活性化化合物（AMBMP）の作用機序の予測を試みた。その結果、Wntシグナルの特異的な活性化化合物として幅広い研究で使用されているAMBMPは、Tubulin重合阻害化合物と同一のクラスターに分類されることが判明した。Tubulin重合阻害試験により、AMBMPはノコダゾールと同様の阻害活性（IC50: 0.33  $\mu$ M）でTubulin重合を阻害することが確認され、さらに、Tubulin

の蛍光免疫染色実験によりAMBMPが細胞内の微小管ネットワークを不安定化すること分かった。これらの結果から、著者は、Wntシグナル活性化作用を期待したAMBMPの活用にはTubulin重合阻害という細胞毒性が存在し、これが細胞老化誘導の原因となると考えた。また、これらの研究成果をもとに、著者は本研究で構築したpathway profiling systemが化合物のオフターゲットの予測と検出に有用であると結論した。

第二の研究課題では、薬剤性腎障害を再現できる*in vitro*細胞評価系の構築を目指し、障害の中心部位である近位尿細管の組織環境の再構成に取り組んだ。近位尿細管では、絶えず原尿が流れており、近位尿細管細胞には常に剪断応力（0.2～1.0 dyne/cm<sup>2</sup>）が負荷されている。この生体環境を細胞評価系で再現するために、著者は、ヒト初代近位尿細管細胞およびマイクロ流路技術を活用し、原尿により生じる剪断応力を模倣した*in vitro*細胞評価系を構築した。構築した薬剤性腎障害を再現できる*in vitro*細胞評価系の有用性を評価するために、まず、薬剤性腎障害の代表化合物であるシスプラチンなどのカチオン性薬物の尿中排泄の中心的役割を担う薬物トランスポーターの1つであるMATE2-Kの発現に注目した。その結果、静置培養でのMATE2-Kの発現量は低レベルであったが、剪断応力を負荷することでその発現量が約10倍程度にまで上昇することが分かった。また、MATE2-Kの特異的な基質であるDAPIの取り込みが剪断応力により上昇することが確認されたことから、剪断応力によりMATE2-Kのタンパク質発現量も上昇していることが明らかになった。次に、このMATE2-Kの発現機構を解明するためにトランスクリプトーム解析を実施した。剪断応力下での細胞培養サンプルを経時的（24, 48, 72時間の3点）に採取し、それぞれの網羅的な遺伝子発現量をNGSにより取得した。取得した経時的なトランスクリプトームデータをweighted gene correlation network analysisによりクラスタリングした結果、MATE2-Kと同様の経時的な遺伝子発現変動を示す遺伝子クラスターについてパスウェイ解析を実施することにより、Nrf2シグナルがMATE2-K発現に強く関与することが示唆された。また、静置培養したヒト近位尿細管細胞にNrf2のネガティブレギュレーターであるKeap1のsiRNAを処理することによりMATE2-KのmRNA発現が上昇し、一方、Nrf2のノックダウンによりmRNA発現が減少することから、MATE2-Kの発現はNrf2シグナルにより制御されていることが明らかとなった。これらの結果は、近位尿細管細胞の静置培養による*in vitro*細胞評価系ではMATE2-Kによるカチオン性薬物の薬物輸送が反映されず、カチオン性薬物による細胞毒性反応が再現できないが、近位尿細管細胞に剪断応力を負荷することで、カチオン性薬物による細胞毒性反応を再現できることを示唆している。

## 審 査 の 要 旨

著者は、低分子化合物を中心とする医薬品の作用機序予測システム、ならびに、生体環境を模倣した*in vitro* ヒト細胞評価系を開発することに成功している。作用機序予測システムでは、網羅的な薬効試験データを活用することで、候補化合物によって誘導される細胞毒性反応のオフターゲットを予測することが可能である。また、*in vitro* ヒト細胞評価系では、剪断応力を負荷した環境下でヒト近位尿細管細胞を培養することで、医薬品の排泄経路の一部を再現することに成功している。これらの成果は、創薬における成功確率の向上や生産性、さらには、副作用の軽減に関する基礎研究領域に大きく貢献するものであり、学問的な価値が高い。総じて、本研究は優れた生物科学的な成果であると評価された。

平成31年1月28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格を有するものとして認める。