

称号及び氏名 博士 (保健学) 西 富 晃 平

学位授与の日付 令和3年3月31日

論 文 名 正常動物を用いた薬効評価モデルの構築とその創薬応用
Construction of drug efficacy evaluation model using normal
animals and its application to drug discovery

論文審査委員 主 査 神谷 重樹
副 査 乾 博
副 査 宮井 和政

学位論文の要旨

新規治療薬を創製するためには、標的分子の理解とその候補物質の作用機序及び薬理作用の検証が必要となる。このような理由から、モデル動物にはヒトの病態や発症機構への類似性、薬効のヒトへの外挿性、データの再現性が求められる。しかしながら、疾患により、これらを満たすモデル作製は困難で、また高いコストや高度な技術が必要となる場合も多く、簡便且つ迅速性に課題があることが多い。そこで、創薬研究プロセスで必要とされる状況に応じて、正常動物を用いた適切な評価モデルを構築し、効率的な活用を試みた。本研究では、1.アルツハイマー病(AD)治療薬標的分子 β -site APP cleavage enzyme 1(BACE1) 阻害によるアミロイド β ペプチド(A β)減少を野生型マウスで定量できる評価系の構築、2. 幼若正常ラットを用いた注意欠如・多動症(ADHD)に対する薬効薬理評価系の構築を行い、正常動物を用いた創薬研究への応用を試みた。

研究1では、BACE1 阻害による A β 産生抑制及びその阻害に伴う分子変化が、野生型マウスにおいて捉えられるか検討した。BACE1 はアミロイド前駆たんぱく質(APP)から A β を切断する責任酵素のひとつであるため、AD 治療における創薬標的となっている。通常、動物における A β 産生抑制評価は、主に家族性 AD 変異を有したヒト APP 遺伝子が導入され、A β が過剰産生するトランスジェニック(Tg)マウスが使用されている。一方で臨床では AD の90%以上が家族性 AD 変異型 APP や A β の過剰発現を伴わない孤発性であることから、BACE1 活性阻害の生理的状況における脳内 A β 抑制作用や APP プロセッシングの解明が必要であると考えられたが、既存のサンドイッチ ELISA 系ではマウス A β を感度良く測定するものはなかった。そこで、新規にマウス A β を感度良く定量するために必要な抗体作成を行った結果、マウス A β の N 末端断端を認識する 14F1 を獲得した。14F1 を用いてサンドイッチ ELISA 系を構築し、マウス初代培養神経細での BACE1 阻害による A β 産生抑制評価、BACE1 KO マウス及び BACE1 阻害剤投与マウスでの脳内 A β 産生抑制評価が適切に実施できることを示した。さらに、BACE1 KO マウス及び BACE1 阻害剤投与マウスでの APP プロセッシング変化、即ち BACE1 阻害に伴う APP 切断経路の変化も検出可能であることを示した。

以上のように、正常動物での BACE1 阻害による A β 産生抑制を評価できる系を構築するとともに、作用点となる APP プロセッシングも評価可能であることを明らかにした。本研究で構築した評価系は疾患モデル動物を用いることなく、簡便迅速に A β 産生抑制能及びその薬理作用の検証ができる点で、医薬品候補のスクリーニングや新規標的分子検証に応用可能であると考えられる。

研究2では、正常動物を用いて ADHD 治療薬に対する薬効評価系構築を行い、さらに標的分子の作用機序を明らかにできるか検討した。これまで ADHD 治療薬を用いた多くの非臨床研究が実施されてきたが、治療薬全てが一貫して有効性を示す評価系もなく、疾患モ

デル動物のゴールドスタンダードと言われるものはなかった。そこで、ADHD 患者で特徴的に認められる衝動的選択行動(我慢して手に入る大きな報酬より、小さくても目先の報酬を求める行動)に注目し、幼若正常ラットを用いて本行動を模倣した評価系の構築を目指した。本行動は ADHD 患者と同様の評価方法である遅延価値割引課題によって評価された。その結果、作用機序が異なる ADHD 治療薬全てにおいて、ラット衝動的選択行動の改善が用量依存的に認められ、ADHD 症状に対して有益な効果があることを非臨床で再現することができた。

次に、本評価系を用いた治療薬の作用機序解明も可能であるか検討を行った。ADHD 治療薬として、ドパミン或いはノルアドレナリン取り込み阻害作用は有しておらず、 $\alpha 2A$ アドレナリン受容体アゴニスト作用を有するグアンファシンを検討に用いた。その結果、グアンファシンのラット衝動的選択行動の改善は、 $\alpha 2A$ 受容体拮抗薬との併用により消失すること、さらにノルアドレナリン神経終末が破壊されたラットを用いた評価から、ポストシナプスの $\alpha 2A$ アドレナリン受容体を介した作用であることが示唆された。

以上のように、幼若正常ラットを用いることで、非臨床からも作用点が異なる ADHD 治療薬に対し、ADHD 症状に対して有益な効果があることが再現できたこと、加えて作用機序解明においても、有益な情報が得られることを明らかにできた。本評価系は、ADHD 患者と同様のパラダイムでの試験であること、また既存 ADHD 治療薬全ての薬効を捉えることに成功していることから、高い妥当性を有していると言える。このため ADHD に対する新規治療薬探索のための確度の高い *in vivo* 評価アセットとなり得る可能性があり、新規 ADHD 治療薬の創薬への応用が期待できると考えられる。

以上2つの研究から、創薬研究プロセスで必要とされる状況に応じて、正常動物と適切な評価系を組み合わせることで、効率的且つ適切な評価が実施可能であることを明らかにした。さらに、本研究で構築された評価系は、新たな創薬標的の妥当性検証にも活用でき、創薬研究への応用の可能性を示した。正常動物を用いた評価モデル構築は、研究2で示すように、特に疾患モデル構築が困難である精神疾患に対して応用できる可能性があり、今後の医薬品等の研究開発に貢献できるものと期待される。

論文審査結果の要旨

本論文は、創薬研究プロセスで必要とされる状況に応じて、正常動物を用いた適切な評価モデルを構築し、効率的な活用を試みたものである。新規治療薬を創製するためには、標的分子の理解とその候補物質の作用機序及び薬理作用の検証が必要となる。このような理由から、モデル動物にはヒトの病態や発症機構への類似性、薬効のヒトへの外挿性、データの再現性が求められる。しかし、疾患によりこれらを満たすモデル作製は困難で、また高いコストや高度な技術が必要となる場合も多く、簡便且つ迅速性に課題があることが多い。そこで本研究では、西富晃平は①アルツハイマー病(AD)治療薬標的分子 β -site APP cleavage enzyme 1(BACE1)阻害によるアミロイド β ペプチド(A β)減少を野生型マウスで定量できる評価系の構築、②幼若正常ラットを用いた注意欠如・多動症(ADHD)に対する薬効薬理評価系の構築を行い、正常動物を用いた創薬研究への応用を試みた。研究①では、アミロイド前駆たんぱく質(APP)から A β を切断する責任酵素のひとつである BACE1 阻害による A β 産生抑制及びその阻害に伴う分子変化が野生型マウスにおいて捉えられるか検討した。新規にマウス A β を定量するために必要な抗体作製を行い、マウス A β を感度良く測定可能なサンドイッチ ELISA 系を確立した。さらにこの測定系が正常動物での BACE1 阻害による A β 産生抑制を評価でき、作用点となる APP プロセッシングも評価可能であることを明らかにした。研究②では、正常動物を用いて ADHD 治療薬に対する薬効評価系構築を行い、さらに標的分子の作用機序を明らかにできるか検討した。これまで ADHD 治療薬を用いた多くの非臨床研究が実施されてきたが、治療薬全てが一貫して有効性を示す評価系はなかった。そこで、ADHD 患者で特徴的に認められる衝動的選択行動に注目し、幼若正常ラットを用いて本行動を模倣した評価系を構築した。ADHD 患者と同様の評価方法である遅延価値割引課題によって評価した結果、作用機序が異なる ADHD 治療薬全てにおいて、ラット衝動的選択行動の改善が用量依存的に認められ、ADHD 症状に対して有益な効果があることを非臨床で再現することができた。また、本評価系を用いて既存の治療薬の作用機序を解明した。今後、新規の創薬候補化合物の探索や評価への応用を検討すべきであるが、研究の骨格の部分には問題はなく、保健学分野の博士論文として十分な水準に達していると認める。

2021年2月3日に第1次審査として個別審査、2021年2月10日に最終審査会において第2次審査を行い、研究分野に関する知識が博士(保健学)に相応しいものであることを確認した。また2021年1月22日に学力確認試験を英語および専門科目として生化学・分子細胞生物学、神経科学・動物科学について行い、西富晃平が上記の科目について十分な学力を有していることを確認した。

以上の結果から審査員一同は本受審者・西富晃平に大阪府立大学大学院・博士(保健学)の学位を与える資格が充分であると認める。