

審査の結果の要旨

氏名 伊佐 真幸

本研究ではチロシンキナーゼ型受容体 (RTK) のケミカルバイオエンジニアリング手法を用いて、1. 局所におけるRTKの役割を理解するため、RTKの限局した場所での活性化手法の確立、2. RTKの一種であるHER2の機能抑制薬の開発を行うために、HER2内在化を誘導する小分子化合物を探索するセルベースのスクリーニング手法の確立を試みたものであり、下記の結果を得ている。

- 1-1. キメラ受容体が機能するかどうかを確かめるため、フルオレセインを多価に配した人工リガンドを用いてRTK由来の細胞内シグナル誘導が生じるかどうかを検証した。その結果、人工リガンド依存的なキメラ受容体の自己リン酸化、細胞内カルシウム濃度上昇の各細胞内シグナル誘導を確認した。この結果から、作製したキメラ受容体は機能し、細胞内シグナル誘導が可能であることが示された。
- 1-2. 分子内に一分子のフルオレセインと多数のケイジドフルオレセインを配したケイジド人工リガンドを用いて、光照射依存的なRTKシグナルの誘導が可能であるかどうか検討した。ケイジド人工リガンドをキメラ受容体に標識し、光照射を行い細胞内でのカルシウム濃度上昇が誘導されるかどうかを検証した。その結果、光照射を行った範囲の細胞でのみ細胞内カルシウム濃度上昇が確認され、局所的なRTKシグナルの誘導が可能であることが示された。
2. HER2の内在化を検出するため、中性付近ではほとんど蛍光を持たず、pH 4-6付近で強い蛍光を持つpH感受性色素を開発した。細胞内小胞の蛍光強度変化のみを指標としたスクリーニングが実施できるかを確かめるために、384 ウェルプレートと蛍光マイクロプレートリーダーを用いて 10,957 化合物のスクリーニングを実施した。ハイスループットスクリーニング系の質の評価指標である"Z'-factor"の値は 94.6%の確率で、優秀な系の基準である 0.5 を超えていたことから、非常に安定

したスクリーニング系であることが示された。スクリーニングでヒットした化合物には、HER2 の内在化を誘導することが報告されている化合物の他に作用が未知の化合物も含まれており、新規 HER2 機能抑制薬の創薬への貢献が期待される。

以上、本論文では RTK シグナルの局所での制御法と HER2 の内在化誘導薬の探索法という二つのケミカルバイオエンジニアリング手法を確立した。本論文で確立したケミカルバイオエンジニアリング手法は、様々な RTK の機能解析や RTK 内在化誘導薬の探索への応用が期待され、本論文は学位の授与に値するものと考えられる。