

氏名・本籍	高松 一彦（茨城県）
学位の種類	博士（理工学）
報告番号	甲第92号
学位授与の日付	平成27年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者
論文題目	Comprehensive analyses of bone marrow cells derived from feed restricted animals (摂餌制限を施した動物における骨髄細胞反応の解析)
審査委員	(主査) 教授 西方 敬人 (副査) 教授 川上 純司 (副査) 教授 藤井 敏司

論文内容の要旨

薬剤候補化合物の非臨床毒性試験においては、化合物が直接的に影響を及ぼす毒性以外に、しばしば二次的な反応が生じる。その一つが、摂餌量低下による骨髄細胞領域の減少（骨髄抑制）とそれに伴う血液学的パラメーターの変化である。しかし、その抑制メカニズムは不明であり、化合物の毒性試験の際に生じる骨髄抑制が、化合物の細胞毒性作用か、あるいは摂餌量低下に起因するかを見極めるのは困難である。そこで本研究では、摂餌制限を施した動物における骨髄細胞反応のプロファイリングを行い、摂餌量低下による骨髄抑制の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

まずラットにおいて、既存の報告通り2週間の摂餌制限で骨髄抑制が誘発されることを確認し、網赤血球数が減少することを新たに見出した。これまで摂餌制限下における報告が不十分であったイヌについても、4週間の摂餌制限で骨髄抑制が生じることを見出した。続いて、軽度な骨髄抑制を起こす条件で摂餌制限を施したラットあるいはイヌの骨髄由来造血前駆細胞の細胞診断（ミエログラム）、及び新たに確立した Colony-Forming Units assay (CFU assay) による分化・増殖能の検査を実施した。その結果、ラット、イヌともに赤血球系の前駆細胞が摂餌制限の影響を受けて減少しやすいことがわかった。さらに、制限期間早期にはすべての分化段階の細胞が、後期には発生段階の進んだ細胞が、それぞれ影響を受けることも示唆された。

次に、摂餌制限を施したラット及びイヌの両種において、骨髄細胞内の遺伝子発現プロファイルの解析を行った (*in vivo* 解析)。また、骨髄由来細胞株である HL60 において低栄養処置によって細胞増殖抑制を誘発し、その際の遺伝子発現プロファイルを解析した (*in vitro* 解析)。 *in vivo* 及び *in vitro* 両解析結果を総合的に評価したところ、摂餌

制限により、細胞死実行経路に関わる遺伝子群の発現変動ならびに *Bcl11b* の発現増加が認められた。

本研究の結果は、骨髄における赤血球系前駆細胞の減少、ならびに骨髄細胞における *Bcl11b* の発現増加が、摂餌量減少による骨髄抑制を見分けるための有用な指標になる可能性を示している。今後の毒性試験において動物に摂餌量低下が認められた場合には、骨髄ミエログラムの実施と併せて CFU assay を実施し、赤血球系造血前駆細胞の障害を精査すること、ならびに骨髄細胞における遺伝子発現解析をおこなうことが求められる。

審査結果の要旨

申請者は、薬剤開発の現場における前臨床試験として、毒性試験の重要性とその問題点を十分に認識している。その中で、臨床試験を安全に行うために、また有用な化合物を見落とさないために、毒性試験における重要な指標である骨髄抑制の評価を正確に行うことが不可欠であることを強く意識していた。毒性試験の際に生じる骨髄抑制が、化合物の直接的毒性作用か、あるいは摂餌量低下に起因するかを見極めるために、摂餌制限下における骨髄抑制誘発メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。その実験は、ラットにおける既存の報告の再検証から始まり、毒性試験の汎用動物種であるにもかかわらずこれまで調べられてこなかったイヌでの実験、電子顕微鏡レベルまで踏み込んだ組織観察、結果の保存性に優れた CFU assay の開発とそれを利用した血液前駆細胞の増殖能力に関する正確な評価、さらには DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現解析にまで及び、個体レベル、組織レベル、細胞レベル、そして遺伝子レベルでのプロファイリングを漏れなく行っている。そこから得られる結果は詳細であり、新しい、いくつもの有用な結果をもたらした。これらの研究内容は、申請者が一流の研究者としての資質を備えていることを十分に示している。また申請者は、その結果をもとに、毒性試験において動物に摂餌量低下が認められた場合に精査すべき点を指摘し、CFU assay や遺伝子発現解析を正確に実施できる体制を施設ごとに整えていくことを提言している。その真摯で力強い提言は、詳細な実験結果に裏打ちされた大きな説得力を持っており、またその研究成果を確実に現場へ還元しようとする姿勢は、社会人大学院生として、また企業の研究者として大いに評価される。

申請者の研究成果は、国際的専門誌において発表され、また学会等においても発表され、国内外において高い評価を受けている。

平成 27 年 1 月 28 日、本学の学位規程に従い公聴会を行い、本論文に関する説明と質疑応答を行った。申請者の説明はきわめて明快であり、応答内容も十分満足できるものであった。

以上により審査委員は本論文提出者（高松一彦）が、博士課程の修了に必要な所定の単位を修得し、かつ、必要な研究指導を受け、博士論文の審査及び最終試験に合格したので、博士（理工学）の学位を授与せられるに充分なる資格をもつものであると認める。