

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	ベスナリノンによるTNF- 産生阻害メカニズムの解析
Title(English)	
著者(和文)	堀田健太郎
Author(English)	Kentaro Hotta
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9257号, 授与年月日:2013年9月25日, 学位の種別:課程博士, 審査員:山口 雄輝,工藤 明,徳永 万喜洋,十川 久美子,小畠 英理
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9257号, Conferred date:2013/9/25, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

## 論文審査の要旨及び審査員

(2000字程度)

報告番号	乙 第 号	学位申請者	堀田 健太郎	
	氏 名	職 名	氏 名	職 名
論文審査員	主査 山口 雄輝	准教授	十川 久美子	准教授
	工藤 明	教授	小島 英理	教授
	徳永 万喜洋	教授		

本論文は「ベスナリノンによる TNF- $\alpha$ 産生阻害メカニズムの解析」と題し、ベスナリノンの tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 産生阻害に関連する新規標的タンパク質として valosin-containing protein (VCP) を同定し、さらに、ベスナリノンが VCP に作用することで、nuclear factor (NF)- $\kappa$ B 経路の活性化に先立つ NF- $\kappa$ B 阻害因子 I $\kappa$ B $\alpha$ の分解を阻害し、TNF- $\alpha$ 産生の阻害を導くという薬理機構を分子レベルで解明したものであり、序論を含む全4章より構成されている。

第1章「序論」では本研究の背景と目的について述べている。ベスナリノンが心不全に対して有用な作用を持つ一方、重篤な副作用として顆粒球減少症を引き起こすために、その使用が制限されていることを述べている。また、ベスナリノンが顆粒球減少症を引き起こすのは、ベスナリノンが造血細胞に直接作用するからではなく、骨髄支持細胞に作用して顆粒球分化誘導因子であるサイトカインや TNF- $\alpha$ の産生を阻害するためである、という先行論文の知見について述べている。さらに、ベスナリノンによる TNF- $\alpha$ 産生阻害機構の解明が今後の安全な薬剤開発に関わる重要な意義をもつことを述べている。

第2章「ベスナリノン標的タンパク質の探索」では、ベスナリノンによる TNF- $\alpha$  mRNA の産生阻害、および、アフィニティー精製によるベスナリノンの直接の結合因子 VCP の単離・同定について述べている。骨髄支持細胞 LP101 とヒト胎児腎臓由来細胞 293T を用いた実験から、ベスナリノンによる TNF- $\alpha$  mRNA の産生阻害が、NF- $\kappa$ B 経路の活性化阻害によるものであることを明らかにし、さらにその作用点が I $\kappa$ B $\alpha$  の分解の阻害であることまでを示している。次いで、ベスナリノン固定化磁性粒子を用いたアフィニティー精製の結果、LP101 細胞の抽出液からベスナリノン結合タンパク質として VCP を精製・同定したことを述べている。さらに、大腸菌発現系を用いて組換え VCP タンパク質ならびに同欠損変異体を調製し、ベスナリノン結合実験を行った結果に基づき、VCP によるベスナリノン結合の特異性や結合領域について言及している。

第3章「ベスナリノンによる NF- $\kappa$ B 経路活性化阻害機構の解析」では、ベスナリノンが VCP を介して NF- $\kappa$ B 活性化を阻害し、その結果、TNF- $\alpha$ を含む NF- $\kappa$ B 下流遺伝子の発現を抑制する、というベスナリノンの薬理機構について述べている。VCP を siRNA によりノックダウンすると、NF- $\kappa$ B 下流遺伝子である TNF- $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\alpha$ 、A20 の mRNA の発現が抑制されることを明らかにし、ベスナリノンが NF- $\kappa$ B に対して阻害的に働くことを示している。次いで、FLAG-I $\kappa$ B $\alpha$ を構成的に発現する 293T 細胞で VCP をノックダウンした後、FLAG-I $\kappa$ B $\alpha$ を免疫沈降しウェスタンブロットティングする実験を通じて、通常は NF- $\kappa$ B の活性化に先立って起こる I $\kappa$ B $\alpha$ の分解が、VCP をノックダウンした細胞では起こらず、ポリユビキチン化された状態で蓄積することを示している。ポリユビキチン化された I $\kappa$ B $\alpha$ の蓄積は、293T 細胞をベスナリノンで処理することによっても濃度依存的に観察されることを見出している。以上の結果から、通常は NF- $\kappa$ B 活性化に先立って起こる I $\kappa$ B $\alpha$ の分解が、ベスナリノン存在下もしくは VCP 阻害条件下ではポリユビキチン化以降、かつ、プロテアソーム分解以前の段階で阻害されている可能性を述べている。次いで、FLAG-VCP や FLAG-I $\kappa$ B $\alpha$ を発現させた細胞の抽出液を用いて共免疫沈降実験を実施した結果、VCP は I $\kappa$ B $\alpha$ とプロテアソームの両方と相互作用すること、そしてベスナリノンは VCP とプロテアソームの間の相互作用を阻害することを見出している。ベスナリノンは VCP と I $\kappa$ B $\alpha$ の間の相互作用には影響しないことから、ベスナリノンの作用点が、VCP とプロテアソームの相互作用の阻害であることを述べている。

第4章「総括」では第2章から第3章に渡って得られた実験結果および知見を総括し、研究の意義や将来の展望を述べている。

以上を要するに、本論文はベスナリノンによる TNF- $\alpha$ 産生阻害のメカニズムを解明し、免疫・炎症応答のハブであり、なおかつ様々な疾病にも関係する NF- $\kappa$ B の活性化制御の新たな側面を明らかにしたという点で、基礎生物学・医科学上貢献するところが大きい。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分な価値があるものと認められる。