公益財団法人薬学振興会
令和5年度 基礎的研究助成　助成一覧

no.	研　　究　　題　　目
1	アポトーシス時に形質膜での先立ったカスパーゼの活性化を駆動する分子機構
2	光操作技術によるアクチン高次構造の時空間的制御メカニズムの解明
3	ミクログリアによるアミロイドB貪食を制御する新規因子の同定および機能解明
4	化学触媒を用いたヒストンアセチル化によるがん治療戦略の開発
5	細胞内温度変動機構の解明
6	可視光応答型NHC触媒の創成
7	リプログラミングを目指し、エフェクターT細胞からのTreg分化抑制機構の解明
8	リソソームを介したプロテオスタシスに細胞内温度変化が与える影響の解析
9	核磁気共鳴法を用いた一過的な膜タンパク質複合体形成機構の解明
10	抗がん剤の効果量とFDA承認の可否判断に関する研究

研究題目	アポトーシス時に形質膜で先立ったカスパーゼの活性化を駆動する分子機構
研究報告	アポトーシス実行因子カスパーゼは，細胞内に点在する基質の切断を介してアポトーシスを実行する．我々はこれまでに，サブ細胞レベルでカスパーゼ活性をイメージングするDual FRETシステムを構築し，アポトーシス時には形質膜において細胞全体に先立ってカスパーゼが活性化することを発見した．また，この活性化にはCaspase-7のN末端に存在する天然変性領域が重要であり，カスパーゼによる切断配列が必要であること，塩基性アミノ酸残基クラスタが必要であること，酸性アミノ酸残基クラスタが抑制すること，を見出した．重要なことに，形質膜での先立った活性化はフォスファチジルセリン(PS)の迅速な外層への暴露に必要であった．以上の研究結果から，カスパーゼの活性化は細胞内局所で分けられて制御されており，対応するイベントが個別に制御されている可能性が示された．しかし依然として，Caspase-7の天然変性領域を介して，形質膜での先立った活性化を制御する分子機構は明らかではなかった．そこで本研究では，我々が確立したDual FRETシステムを基軸とし，形質膜での先立った活性化に必要な分子機構を解明することを目指した． 酸性リン脂質はタンパク質の塩基性アミノ酸残基と相互作用することでタンパク質の局在を制御することが知られている．そこで，Caspase-7のN末端に存在する天然変性領域と，酸性リン脂質PS及びその他の主要なリン脂質との相互作用を検討した．その結果，当該天然変性領域は，切断によって酸性アミノ酸残基クラスタが除去された場合にのみ，塩基性アミノ酸残基クラスタ依存的にPSと特異的に相互作用することが明らかとなった．そこで，形質膜において先立ってカスパーゼが活性化することに対するPSの効果を検討するため，PSに特異的に結合するラクトアドヘエリンC2ドメインを細胞内に発現し，PSを遮蔽した．その結果，形質膜におけるカスパーゼの活性化が遅滞した．したがって，Caspase-7の塩基性アミノ酸残基クラスタと酸性リン脂質PSとの相互作用が形質膜において細胞全体に先立ってカスパーゼが活性化することの分子基盤であることが明らかとなった．通常，PSは形質膜の内層に存在する．アポトーシス時には，リン脂質スクランブラーゼXkr8がカスパーゼによって切断されることで活性化し，PSを外層へと暴露する．重要なことに，形質膜での先立った活性化はアポトーシス時におけるXkr8の迅速な切断に必要であることが，EGFPをタグしたXkr8の細胞内局在観察より明らかとなった．したがって，形質膜での先立った活性化は，Xkr8の迅速な切断を介してPSの外層への迅速な暴露を制御することが示された．外層へと暴露されたPSは，アポトーシス細胞の貪食(eat-me)シグナルとして機能することが知られている．そこで，Caspase-7の，アポトーシス細胞の貪食に及ぼす影響を評価した．その結果，Caspase-7ノックアウト細胞では，野生型細胞と同様に細胞全体でのカスパーゼの活性化が観察されるものの，その後の貪食による除去が遅延することが明らかとなった．以上の一連の結果から，形質膜での先立ったカスパーゼの活性化がCaspase-7-PSの相互作用によって駆動され，その生理的な意義としてアポトーシス細胞の貪食による迅速な除去に貢献することが明らかとなった．

研究題目	光操作技術によるアクチン高次構造の時空間的制御メカニズムの解明
研究報告	アクチン繊維によって形成される高次構造は、細胞内で時空間的に多様に変化することが知られており、その動的な変化と構造体間の連携が、細胞の多様な形態変化や柔軟な遊走機構に寄与すると考えられている。また、このようなアクチン繊維の機能は、がん細胞の浸潤や転移に関与するため、その制御原理を理解することは創薬の観点からも重要な課題である。しかし、アクチン高次構造の時空間的な制御および構造体間の連携機構は、細胞内部の生化学的および構造的な複雑性のために理解が遅れている。そこで我々は、光を用いて細胞内部のアクチン高次構造を時空間的に操作する技術を開発し、アクチン高次構造の時空間的な制御原理およびがん細胞における制御機構を明らかにすることを目的とした。 我々は、光応答性化合物を用いて、光照射によって局所的かつ一過的にアクチン繊維網の構造を破壊する技術を独自に開発した。ヒト培養細胞の生細胞イメージングによる詳細な観察の結果、細胞膜直下のアクチン繊維を局所的に破壊した際に、細胞質に存在するアクチン繊維の量が一過的に増加することがわかった。また、細胞質アクチン繊維の増加に伴い、細胞膜アクチン繊維の量が細胞全体で著しく減少することを見出した。この観察から、細胞膜直下のアクチン繊維と細胞質のアクチン繊維が相互作用することが示唆された。次に、アクチン構造体間相互作用に寄与する因子群を同定するために、阻害薬等を用いたスクリーニングと候補因子群のイメージングを行った。その結果、細胞膜アクチン繊維の破壊に伴う、細胞内における特定のイオン濃度の上昇が、細胞質アクチン繊維の増加に寄与することが示唆された。これらの結果は、細胞内において、異なるアクチン繊維構造が、特定のイオンの制御を介して制御されることを示唆した。現在、アクチン構造体間の相互作用機構のさらなる理解のため、特定のイオンに応答してアクチン繊維の制御に寄与する因子群の探索を行っている。今後は、さらに、遊走や分裂といった、細胞の多様な形態変化におけるアクチン構造体間相互作用の時空間的制御機構の理解を目指す。

研究題目	ミクログリアによるアミロイドβ貪食を制御する新規因子の同定および機能解明
研究報告	本研究では、アルツハイマー病(AD)治療標的として注目されるTREM2の機能制御機構の解明を目指し、TREM2欠損ミクログリア細胞株における生存性低下を代償する因子の同定を試みた。ゲノムワイドノックアウトスクリーニングとその後の多段階バリデーションにより、既知のTREM2制御因子であるINPP5Dを含む10の新規因子を同定することに成功した。 同定した因子の中には、TREM2と遺伝学的相互作用を示すTSC1や、INPP5Dと同様にPIP3ホスファターゼ活性を有するPTENが含まれていた。これは、同定因子群にTREM2の負の制御因子が濃縮されていることを示唆すると共に、ミクログリアの生存性維持におけるPIP3シグナル経路の重要性を示している。特に興味深いことに、INPP5DとPTENは共にPIP3ホスファターゼでありながら、INPP5Dの発現抑制のみがAβ取込みを促進した。この結果は、両分子が代謝するPIP3プールが機能的に異なる可能性を示唆している。このような脂質シグナルの多様性は、TREM2依存的な生存性維持とAβ貪食という、異なる細胞機能の選択的な制御を可能にする機構として注目される。 さらに、同定された因子のうち、PAK2とDOK1の発現抑制もまた、TREM2欠損とは逆にAβ取込みを促進することを見出した。PAK2については、既知のキナーゼ阻害剤を用いた解析により、その酵素活性ではなく、タンパク質間相互作用などの足場タンパク質としての機能がAβ貪食制御に重要である可能性が示された。 DOK1に関しては、そのホモログであるDOK3がTREM2とINPP5Dの相互作用を安定化することが報告されていることから、DOK1についても同様の機能を持つ可能性を検討した。しかし、in situ proximity ligation assayによる解析から、DOK1はTREM2-INPP5D相互作用の制御には関与しないことが示された。一方で、DOKファミリーの機能解析により、DOK2もまたAβ取込みを負に制御することを見出した。 本研究ではさらに、培養細胞で得られた知見の生理的意義を検証するため、ADモデルマウスの生体内ミクログリアに対する遺伝子導入を試みた。具体的には、ミクログリア特異的な遺伝子導入ツールとして報告のあるAAV-MG1.2およびAAV-YAFGGEGベクターを調製し、同定した因子の発現抑制を試みたが、既報で示されているような効率的な遺伝子導入を再現することはできなかった。この結果は、生体内ミクログリアへの遺伝子導入技術にはさらなる最適化が必要であることを示している。 本研究により、ミクログリアのTREM2依存的な生存性維持とAβ貪食活性の制御に関与する新規因子群を同定すると共に、これらの機能が部分的に異なる経路により制御される可能性を示した。特に、PIP3シグナルの多様性やDOKファミリーを介した新規制御経路の存在は、TREM2依存的なミクログリア機能の選択的な制御機構の理解に新たな視点を提供するものである。

研究題目	化学触媒を用いたヒストンアセチル化によるがん治療戦略の開発
研究報告	本研究では，酵素の機能を代替する人工触媒システムによってヒストン修飾を直接制御し，がん抑制効果を発揮することを目指す。申請者らのこれまでの研究により，生細胞内のH2BK120を選択的にアセチル化し，同じ残基に導入される内在性の翻訳後修飾であるH2BK120のユビキチン化(H2BUb)を阻害する触媒システムを開発している。難治性の白血病であるMLL転座白血病の悪性化には，エピゲノム異常が関与することが知られている。MLL転座白血病では，H2BUbを介したポジティブフィードバックによってがん遺伝子が活性化されており，H2Bのユビキチン化酵素であるRNF20のノックダウンが，MLL転座白血病細胞の増殖を阻害することが示されている。そこで，人工触媒システムによってMLL転座白血病細胞のH2BK120をアセチル化し，それによってH2BUbを阻害することで，新たな治療戦略になると考えた。本研究では，触媒構造を改変して触媒活性と細胞膜透過性の改善することで，白血病細胞選択的な増殖阻害を目指す。さらには，触媒システムの生体内での安定性・血中滞留性を改良することで，白血病モデルマウス個体における抗がん効果の実証も目指す。 まず、触媒構造の検討の結果、培地中に加えるのみの簡便な操作によって白血病細胞に選択的に導入され、白血病細胞内のヒストンをH2BK120選択的にアセチル化することができる新規触媒BAHA-LANA-PEG-CPP44を開発した。この触媒を白血病モデル細胞のTHP-1に適用することにより、細胞増殖阻害効果を発揮できることを見出した。また、触媒によるアセチル化処理をした白血病モデル細胞をマウスに投与したところ、アセチル化処理をしていない細胞を投与した場合と比べ、がんの増殖が抑制されていることも分かった。これらの実験により、当初の目的通り、触媒を用いた全く新しいメカニズムによる抗がん戦略を提示することができたと考えている。さらに詳細な解析を進めたところ、触媒によるアセチル化によって、NELFという転写因子のクロマチン局在が変化し、がん抑制遺伝子をはじめとする特定の遺伝子群の転写が変化することも見出している。今後は、この転写変化の詳細なメカニズム解析や、マウス個体内でのヒストンアセチル化による抗がん効果の実証に向けた検討を行う予定である。

研究題目	細胞内温度変動機構の解明
研究報告	これまでに独自に開発した蛍光性ポリマー温度センサー（FPT）を用いた細胞内温度イメージング研究から発見した細胞の構造や機能と関連した時空間的な温度変化は、細胞内局所で発生した熱はそこに存在する生体分子の状態や活性に影響することで細胞機能に貢献している可能性を示した。これは従来からよく研究されてきた細胞内情報伝達機構とは物理量変化による機構の点で大きく異なる現象であり、これを温度シグナリングと呼び、本研究ではその実証とその機構の解明に取り組んだ。 まず、生理機能における細胞内温度シグナリングの関与検証するために、神経分化に着目した。神経幹細胞は、刺激により神経細胞へと分化する。神経分化を誘導する機構は、様々な化学的シグナル伝達の他にも、温度（高温）刺激も報告されている。しかし、神経分化における細胞がもつ内在性熱源による自発的な細胞内の温度分布やその変化の関与は不明であった。PC12細胞は、神経分化因子によって神経分化が誘導され、神経突起を伸ばし、神経細胞と同様の分化マーカーを発現する。最近、PC12細胞内温度分布の操作と観察のアプローチを駆使することで、細胞内局所の微細な温度変化が神経分化に及ぼす影響や、神経分化における細胞内の温度分布変化を解明し、細胞内温度が支配する新規の神経分化機構を発見した。 さらに、細胞内の温度変化の機構を検証するために、細胞内熱移動の観察に挑戦した。FPTを用いて細胞内温度分布を高速で追跡する方法を開発し、赤外レーザーを照射して細胞内部を加熱することで、細胞内の温度分布の変化を数十msの時間分解能かつ回折限界の空間分解能で追跡した。この結果、単一細胞の有限領域の平均温度緩和は、同サイズの水に比べて著しく遅い（約1秒）ことがわかった。さらに、種々の加熱条件での温度分布追跡の検討から、熱伝導に依存しない細胞内温度緩和の存在を明らかにした。これにより、蛍光性温度計で記録できる細胞内の温度変化は単純な熱伝導方程式に従わない温度を含むことを発見した。加えて、細胞生物学的なアプローチによる努力の結果、この温度緩和が特定の細胞内分子や反応の影響を受けていることを解明した。

研究題目	可視光応答型NHC触媒の創成
研究報告	NHC (N-ヘテロサイクリックカルベン) は比較的安定なカルベン種であり、有機分子触媒や遷移金属の配位子として盛んに利用されてきた。一方で、NHC を励起させて用いる例は限定的である。NHC が容易に遷移金属等に強固に配位してしまうため、外部光触媒等を用いることができないことが一因である。そこで申請者は、分子内に Photoredox を起こすユニットを導入した NHC に着想した。本分子は電子豊富なカルベンの孤立電子対から電子不足な部位に電子遷移が進行し、ラジカル化学種が生成すると期待できる。そこで、本研究では、可視光応答型NHC触媒の合成、そしてそれを用いる特異な C–H 活性化などの反応開発を試みた。 まず、触媒の合成に取り組んだ。その結果、合計 7 種類の NHC 触媒前駆体となる分子の合成に成功した。なお、すべての分子骨格には同様の Photoredox を起こすユニットを導入した。合成した NHC 触媒前駆体から、塩基を作用させることで NHC を発生させると、予想通り溶液の色が薄黄色から赤色に変化した。すなわち、NHC の発生に伴う吸収波長の長波長化であり、これは作業仮説通り、電子豊富な NHC からの電子遷移が可能となったことに起因していると考えられる。^{13}C NMR からも、NHC に特徴的なピークを観測しており、可視光を吸収可能な NHC が発生していることが確認できた。 続いて、合成した 7 種の内、最も活性が高かったものを用いて、C-H 結合の活性化を検討した。その結果、エーテル酸素のα位や、シクロアルカンなど、様々な分子において C-H 結合の引き抜きによりラジカル種を発生させることが可能であった。本手法によって C-H 結合に対しマイケルアクセプターや窒素含有官能基の導入に成功した。 以上のように、本研究ではこれまでの利用方法とは全く異なる観点から NHC 触媒を見つめ直し、可視光を積極的に利用可能な新たな触媒を開発することに成功した。

研究題目	リプログラミングを目指し、エフェクターT細胞からのTreg分化抑制機構の解明
研究報告	本研究は、エフェクターT細胞（Teff）からの制御性T細胞（Treg）分化抑制機構を明らかにすることを目的とし、それぞれの研究計案に対して以下の研究結果を得た。 **研究計画(1) TeffからのFoxp3発現誘導抑制機構の解明** Teffと末梢ナイーブT細胞、それぞれから試験管内（in vitro）でFoxp3陽性T細胞を誘導するiTreg培養系を行った結果、既報通りナイーブと比較してTeffからはFoxp3発現誘導が強力に抑制された。そこで、その原因を追求したところ、以下3つの可能性が示唆された。 ①Teff由来の炎症性サイトカイン ②Naive由来の誘導促進因子の欠如 ③Teff固有のエピゲノム ①については、5種類のサイトカイン中和抗体をiTreg培養系に添加すると、TeffからのFoxp3発現誘導が増加することが分かった。さらに5種類の中から、どのサイトカインがFoxp3発現誘導抑制に寄与しているのかを検証した結果、3種類のサイトカインが特に重要であることが分かった。 ②の因子を探索する目的で、Naive vs.Teff由来のiTregでRNA-seqとATAC-seqを行う。現在サンプル回収まで行い、今後NGS解析に進む予定。両者で発現や活性化が変動している分子やシグナルを探索する。さらにクロマチンが変動している領域を探索し、該当領域の転写因子結合モチーフを解析し、選択的に活性化または抑制されている転写因子を推測する。RNA-seqとATAC-seqとの共通項を候補とする。 ③Teff固有のエピゲノム：NaiveとTeffでFoxp3発現誘導に寄与する遺伝子座のエピゲノム修飾状態が異なる可能性を示唆する知見を得た。そこで、両者のエピゲノム修飾（特にヒストン修飾）の状態をChIP-qPCRで比較解析するために、まずヒストンChIP-qPCRのセットアップを行い、ポジテイブコントールで問題なくワークすることが確認できた。今後ナイーブ vs. Teffの比較を行う予定である。 **研究計画(2) TeffからのTSDR脱メチル化抑制機構の解明** これまでの検討から、ナイーブと比較して、TeffではFoxp3発現誘導とは別の機構でTSDR脱メチル化も抑制されている可能性がある。そこで、まずナイーブでTSDR脱メチル化に必須の因子を同定する目的で、TSDR脱メチル化をレポートできる独自の培養法を用いて、全ゲノムCRISPRスクリーニング法を行った。その結果、あるエピゲノム修飾因子が有力な候補として見つかってきた。今後、その因子がナイーブからのTSDR脱メチル化に必須であるか否か、Teffではどのように関与しているのかを検証していく予定である。

研究題目	リソソームを介したプロテオスタシスに細胞内温度変化が与える影響の解析
研究報告	申請者らはTDP-43凝集体の性状について、リソソームやTMEM106Bの影響を合わせながら以下の方法で解析を進めた。 まず細胞内局所温度に依存するTDP-43凝縮機構に対するTMEM106Bの影響を検討するために、TMEM106Bを恒常的に過剰発現するCOS7モノクローナル細胞株を作製した。この細胞株に対し、N末端にEGFPを付加し核移行シグナルを欠損させたTDP-43（EGFP-TDP-43ΔNLS）を一過性に発現させた。赤外線レーザーを用いて細胞質内の一点を照射することで局所温度を上昇させると、照射部位にTDP-43が集まり、凝縮体を形成することをこれまでに見出していた。このとき、TMEM106B恒常過剰発現細胞株では、このTDP-43凝縮体形成が有意に促進された。この結果は、TMEM106Bが温度依存性TDP-43凝縮の制御分子であることを示唆する。 TMEM106BによるTDP-43凝縮制御メカニズムとして、細胞内温度への影響を想定した。そこで温度依存的に蛍光寿命が変化するポリマーFluorescent Polymeric Thermometer（Okabe et al., Nat. Commun, 2012）を37°Cで培養しているCOS7細胞内に導入し、その蛍光寿命を計測することによって細胞内温度を推定した。その結果、コントロール細胞の細胞内平均温度は34.3±0.46℃であったが、TMEM106B恒常過剰発現細胞株では35.3±0.39℃であり、平均温度が約1°C高いことが明らかになった。このことから、TMEM106Bは細胞内温度の制御に関わっており、その発現量増加により細胞内温度が上昇し、温度依存性TDP-43凝縮機構に寄与する可能性が示唆された。 本研究から、TMEM106Bの過剰発現による細胞内平均温度上昇が、レーザー照射によって誘導されるTDP-43凝縮体形成過程を促進させることが示唆された。細胞内平均温度の上昇がTDP-43の性状を変化させ、局所温度上昇に対するTDP-43の応答性や凝集性を亢進させている可能性が考えられる。これらの細胞内温度に係る研究については、薬学系研究科・船津高志教授、岡部弘基助教およびケンブリッジ大学Dr. Stefan Marciniak教授との共同研究により遂行した。

研究題目	核磁気共鳴法を用いた一過的な膜タンパク質複合体形成機構の解明
研究報告	【背景・目的】B細胞における抗体産生や記憶B細胞への分化は、細胞表面に発現するB細胞受容体（BCR）による抗原認識とシグナル伝達により開始される。B細胞活性化の異常は、自己免疫疾患とも関連しており、BCR活性化機構の解明は創薬の観点からも重要である。BCRのシグナル伝達は、共受容体であるCD19によって増幅される。CD19が共受容体として機能するためには、テトラスパニンCD81との複合体形成によるB細胞表面への輸送が必須である。CD81単独およびCD19-CD81複合体の構造解析から、CD81にコレステロールが結合し、CD19-CD81複合体形成を抑制することが示唆された。BCR近傍の形質膜にはコレステロールが多く含まれることから、コレステロールがCD81とCD19の相互作用を制御することで、B細胞活性化に関与している可能性が考えられる。一方で、生理的な脂質二重膜環境およびコレステロール濃度においてCD19-CD81複合体の制御がなされるかは未解明である。本研究では、異なる濃度のコレステロールを含む脂質二重膜中でCD19-CD81複合体の構造解析を行い、CD19およびCD81の機能制御機構を解明することを目的とした。 【手法・結果】1. 界面活性剤ミセル中のCD19-CD81複合体のNMR観測 申請者らが独自に開発した哺乳細胞発現系における安定同位体標識法を用いて、CD19-CD81複合体のNMR試料を調製し、界面活性剤LMNGミセル可溶化条件で、NMR測定を行った。CD19のメチオニン残基を変異させることで、部分的にNMRシグナルの帰属を得た。その結果、CD19由来のメチオニン6残基由来のNMRシグナルが観測された一方、CD81由来のメチオニン5残基については、NMRシグナル強度が低く、観測されていないことがわかった。 2. 脂質二重膜中のコレステロール濃度依存的なCD19-CD81複合体の構造変化 脂質二重膜中でCD19-CD81複合体を解析するために、Saposin-Aでディスク状の脂質二重膜を安定化したSalipro粒子を利用した。安定同位体標識CD19-CD81複合体を、0および20mol%のコレステロールを含む脂質組成でSalipro粒子に再構成し、NMR測定を行った。コレステロール0mol%条件ではLMNGミセル試料と同様のスペクトルが得られたが、20mol%条件ではCD19由来の一部のNMRシグナルが消失した。 【考察】CD81のメチオニン残基由来のNMRシグナルが観測されなかったことから、CD81膜貫通領域は複数の構造間をミリ秒オーダーの時間スケールで交換していることが示唆された。CD81をはじめとしたテトラスパニンは様々な膜タンパク質との相互作用によるドメイン形成が提唱されており、この膜貫通領域の運動性が多様な相互作用に寄与していると考えられる。コレステロールを20mol%含む脂質二重膜中で、CD81との相互作用界面に近いCD19由来のNMRシグナルが消失したことは、コレステロールによってCD19とCD81の相互作用様式が変化、あるいはCD19とCD81が解離した可能性を示唆している。形質膜におけるコレステロール平均濃度が20-30mol%であることから、生理的なコレステロール濃度の変化は、CD19-CD81複合体の相互作用を制御しうる。

研究題目	抗がん剤の効果量とFDA承認の可否判断に関する研究
研究報告	ClinicalTrial.govで1990年1月1日から2021年1月1日までに開始したPhase 3 interventional studyで、Survivalを評価項目に含む試験を検索し、さらに分析条件に適合した208試験を分析対象とした。 208試験のうち、79試験（38%）がFDAによって承認され、129試験（62%）が非承認であった。承認ステータスおよび薬事優遇指定ステータスごとに、OSにおける効果量（平均的なハザード比）をランダム効果モデルにて推定したところ、承認薬はHR 0.70 [95% CI 0.68-0.73]、非承認薬はHR 0.95 [95% CI 0.93-0.97]であり、明確な差があった。承認薬および非承認薬を含む全試験の効果量は、HR 0.85 [95% CI 0.83-0.87]であった。 全生存期間（OS）のハザード比に対して、FDA承認薬および非承認薬の試験数をヒストグラムとして表示したところ、FDA承認薬と非承認薬はそれぞれ一峰性の分布を示した。両者は、HR 0.70-0.90の範囲で重なっていた。ヒストグラムの各ビン内で承認確率を算出しOSのハザード比に対してプロットすると、逆S字状の曲線を示した。承認確率20%-80%を与えたのはHR 0.74-0.86であり、この範囲を境界域として特定した。この承認確率曲線は、HR 0.80で承認確率50%を与えることを示した。 安全性、試験デザイン、医療ニーズなど有効性以外の因子を調整した、FDA承認ステータスに対する固定効果ロジスティック回帰モデルでは、OSのハザード比（-29.907, p < 0.001）、対照薬の市場での経過年数（-2.581, p = 0.008）、部分的なレジメン構成薬剤の入れ替えを目的とした試験群の設定（4.012, p = 0.079）が有意な相関を示した。OSのハザード比は絶対値として最大の回帰係数を有しており、検討した因子の中で最も強い相関を示した。本モデルにおいて、OSのハザード比が0.75から0.85に増加すると、承認確率は79.6%から16.4%へ顕著に低下した。 境界域の形成には、薬の社会的な価値判断、科学の発展や技術革新のスピード、薬事行政上の変化、医薬品開発における経済的な制約条件など、複雑な要因が関係すると思われる。このような要因は時代を経るごとに変遷していくため、境界域も変遷することが予想される。しかし本研究においては、年代を区切っても境界域に明確な変化は認められなかった。興味深いことに、年代を経るごとに、FDA承認薬・非承認薬を含めた開発品目全体の平均OSハザード比は低下しており、開発品目の有効性が時代とともに向上する傾向にあった。これを反映して、年代を経るごとに承認確率も増加する傾向を示した。これには、特に2013年以降、著しく発展したがん免疫療法による治療成績の向上が寄与したものと考えられる。今後も新たな作用機序の薬剤が登場し、開発品目の全体的な治療成績が向上していく可能性がある。このような科学技術の発展に合わせて境界域を変えていくべきか、科学技術の発展にかかわらず境界域を堅持すべきか、公衆衛生上の観点から継続した議論が必要である。