

論文の内容の要旨

論文題目 HIF Prolyl Hydroxylase Inhibitor's Effects on Skeletal Muscles (PHD 阻害薬が骨格筋に与える影響について)

氏名 竹村 浩至

近年、慢性腎臓病 (CKD) は増加の一途を辿っている。腎性貧血は CKD の重大な合併症であり、また CKD 患者の生命予後や quality of life (QOL) に強く相関すると考えられている。CKD 患者では腎臓におけるエリスロポエチン (EPO) の産生が低下することで腎性貧血をきたすが、その治療は EPO 製剤および鉄の補充が主体であり、輸血を除く唯一の方法であると言っても過言ではない。しかしながら近年 Hypoxia inducible factor (HIF) prolyl hydroxylase (PHD) system を利用した PHD 阻害薬と呼ばれる新規治療薬が開発されている。その 1 つである roxadustat は透析の有無に関わらず CKD 患者の腎性貧血治療において有効であることが示され、また日本でもすでに承認を受けている。

HIF は α サブユニットおよび β サブユニットからなるヘテロダイマーであり、その α サブユニットの型に応じて HIF1-3 の 3 種類のアイソフォームを有する。HIF は通常酸素分圧下では PHD による水酸化により速やかに分解されるが、低酸素条件下では PHD 活性が低下することで安定化し、その結果下流遺伝子の発現が促進される。Epo 遺伝子の発現は主に HIF-2 α によって制御されており、PHD の阻害によって HIF-2 下流の Epo 遺伝子発現が亢進する結果、エリスロポエチン産生の増加そして腎性貧血の改善に至る。

PHD 阻害薬はその造血作用から世界アンチドーピング機構にエリスロポエチンなどと並び禁止薬物に指定されている。roxadustat は上市される前の 2015 年にすでにアスリートの尿検体から検出されておりドーピング薬剤としてすでに使用されているが、一方で PHD 阻害薬が骨格筋や運動能力に与える影響については十分に明らかにはなっていない。

筋肉における酸素分圧は安静時 PO_2 が 27mmHg 程度であるが、軽微な運動でも 5mmHg 以下まで低下すると言われ、HIF-PHD system はその低酸素応答に関与することが知られている。過去に、骨格筋局所での Phd1 ノックダウンマウスにおいて持久力が低下する、Phd2 コンディショナルノックアウトマウスでは血中 Hb 値の上昇とともにランニングトレーニングによる持久力向上効果の上昇が見られる、また速筋から遅筋へのタイプシフトが見られるなど様々な報告がされている。

我々の研究は、PHD 阻害薬が実際に骨格筋や運動能力に対していかなる影響を与えるかについて、*in vitro* および *in vivo* 両方で検討を行った。

まずマウス骨格筋筋芽細胞である C2C12 細胞を用いて実験を行った。C2C12 は、10%ウシ胎児血清 (FBS) を含む増殖培地において増殖させた後に 2% horse serum を含む分化培地に培地変更することで、筋芽細胞 (myoblast) から筋管細胞 (myotube) へと分化する。成熟した筋管細胞に対して 10 μ M の roxadustat を 24 時間投与した際の変化を検討したところ、HIF 下流遺伝子の発現上昇を認めた。分化に関する指標に有意な変化を認めなかったが、エネルギー代謝において有意な変化を認めた。roxadustat 投与により Glut1 遺伝子発現増加を伴う糖取り込みの亢進を認め、また培地中の乳酸濃度の上昇を認めた。あわせて細胞外フラックスアナライザーによる代謝解析を行ったところ、解糖系の亢進およびミトコンドリア呼吸の抑制を認めたが、レンチウイルス粒子を用いた shRNA 導入により HIF-1 α をノックダウンしたところそれらの変化が消失したことから、それらが HIF-1 依存的な変化であることが示唆された。同時にミトコンドリア DNA コピー数の減少やミトコンドリア分裂の促進を認めた。

続いて 8 週齢メスの C57BL6/J マウスに対して roxadustat を胃管から経口投与する実験を行った。単回投与後 (30 mg/kg) には、血漿中 EPO 濃度はコントロール群に比して高値を示し、また肝臓・腎臓で HIF 下流遺伝子の発現が増加したのに加え、骨格筋においても HIF-1 蛋白の安定化および HIF 下流遺伝子の発現亢進の結果が得られた。roxadustat 単回投与で

は血中 Hb 値の上昇は見られず、またトレッドミルによる持久力測定にも変化を認めなかったが、週 3 回・5 週間の長期投与では、血中 Hb 値の上昇を伴ったトレッドミル走行による持久力測定結果の改善を認めた。また筋重量の変化は認めなかったものの腓腹筋における遅筋割合の増加を認めた。一方で、瀉血および同量の細胞外液補充による血液希釈を行ったところ、持久力の上昇効果は消失した。この結果から、roxadustat 長期投与による持久力上昇効果は主に造血作用に起因していると判断された。また roxadustat 投与による代謝変化を観察したところ、単回投与の空腹時血糖の推移は投与 3 時間後に投与群でコントロール群に比して血糖低値を示した。長期投与マウスにおいては随時血糖および乳酸値を測定したが、有意差は認めなかった。

本実験によって、腎性貧血に対する新規治療薬である PHD 阻害薬の 1 つである roxadustat は、骨格筋細胞において酸化的リン酸化から解糖系へのシフトを誘導し、またその造血作用によりマウスのトレッドミル走行の持久力を改善させることが示された。