

審査の結果の要旨

氏名 竹村 浩至

本研究は、慢性腎臓病(CKD)の合併症である腎性貧血治療薬として開発された HIF Prolyl Hydroxylase Inhibitor (PHD 阻害薬)が骨格筋に与える影響について明らかにするため、PHD 阻害薬の一つである roxadustat を用いてマウス骨格筋筋芽細胞 (C2C12 細胞)による細胞実験および C57BL6/J マウスを用いた動物実験を施行しその効果の評価を試みたものであり、下記の結果を得ている。

- 1、C2C12 細胞の筋芽細胞 (以後 myoblast) を筋管細胞 (以後 myotube) に分化させた後に roxadustat を 24 時間添加したところ、HIF 下流遺伝子の発現上昇を認めた。分化マーカーとなる Myh/Myog の遺伝子発現・Myosin heavy chain の蛋白量・Fusion index といった分化指標には変化を認めなかった。
- 2、C2C12 細胞において 2-NBDG を用いた glucose uptake assay にて糖代謝の評価を行ったところ、insulin 有無に依らず糖取り込みが亢進した。Glut1 遺伝子の発現亢進を認めており、その関与が示唆された。
- 3、エネルギー代謝の変化を、レンチウイルス粒子を用いた shRNA 導入により HIF1 α をノックダウンした C2C12 細胞も併せて用いて評価した。細胞外フラックスアナライザーを使用した解析により、roxadustat は解糖系の指標となる proton efflux rate を亢進させる一方でミトコンドリア呼吸の指標である oxygen consumption rate を抑制し、またそれらは HIF1 α ノックダウンによりキャンセルされたことから同変化は HIF1 依存的であることが示された。
- 4、前述の代謝変化を踏まえてミトコンドリアにおける変化について評価したところ、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。
- 5、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。
- 6、roxadustat 単回投与では血中 Hb 値の上昇は見られず、またトレッドミル走行による持久力評価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 roxadustat 投与群に対し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考えられる。

- 7、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。

以上、本論文は、roxadustat がマウス骨格筋 C2C12 細胞において筋分化に有意な影響を与えないが、糖取り込みの亢進および解糖系亢進・ミトコンドリア呼吸の抑制という代謝変化を与えることを明らかにした。また C57BL6/J マウスにおける roxadustat 投与実験により、5週間の長期投与で主に血中ヘモグロビン値の上昇に起因すると考えられる運動持久力の改善を認めることが明らかとなった。同時に遅筋の増加や、空腹時血糖の低下といった作用も観察された。本研究は腎性貧血の治療薬である同薬剤が筋肉に与える薬理作用の一部を明らかにするとともに、今後慢性腎臓病患者の治療を始めとする臨床使用における一助になると考えられる。

よって本論文は博士（医学）の請求論文として合格と認められる。