

論文の内容の要旨

論文題目 Prolyl Hydroxylase (PHD) Inhibitor Improves Glucose and Lipid Metabolism and Decreases Albuminuria in a Mouse Model of Type 2 Diabetes

(PHD 阻害薬は 2 型糖尿病マウスの糖と脂質代謝を改善し、アルブミン尿を減少させる)

氏名 菅原 真衣

プロリン水酸化酵素 (prolyl hydroxylase domain : PHD) 阻害薬は、低酸素誘導因子 (hypoxia-inducible factor : HIF) を活性化することによって、エリスロポエチン産生を誘導する薬剤で、腎性貧血の新たな治療薬として注目されている。HIF は低酸素応答の要となる転写因子で、 α サブユニットと β サブユニットからなるヘテロ二量体である。HIF- α は細胞内で常に産生されているが、通常酸素分圧下では PHD によって特定のプロリン残基が水酸化され、ユビキチンリガーゼ複合体を構成する von Hippel-Lindau (VHL) 蛋白に認識される。ユビキチン化された HIF- α は速やかにプロテアソームで分解されるため、通常酸素分圧下では HIF の転写活性は消失する。一方、細胞が低酸素になると PHD の活性が低下し、HIF- α は分解を免れて核内に移行する。そして HIF- β と結合してヘテロ二量体を形成し、遺伝子の発現制御領域である hypoxia response element (HRE) に結合して、ターゲット遺伝子の転写を促進する。PHD 阻害薬は、HIF- α の分解を抑制することによって HIF を活性化し、下流遺伝子の一つであるエリスロポエ

チン産生を誘導する。内服による Hb 上昇効果はすでに示されており、現在複数の製薬会社が第Ⅱ相および第Ⅲ相臨床試験を行っている。

PHD-HIF はエリスロポエチンだけでなく、様々な遺伝子の発現制御に関与するため、PHD 阻害薬は貧血改善以外の効果を示す可能性がある。その一つが代謝異常の改善で、PHD 阻害薬の第Ⅱ相臨床試験では、内服期間中に総コレステロールが有意に低下することが示された。また、PHD アイソフォームの一つである PHD2 の発現を低下させた遺伝子改変マウスでは、高脂肪食による肥満や耐糖能異常が軽減したと報告されている。本研究では、PHD 阻害が 2 型糖尿病の新たな治療戦略となりうるか検証するため、BTBR *ob/ob* マウスに PHD 阻害薬を投与し、糖と脂質代謝を評価した。

糖尿病治療の最大の目的は、高血糖による合併症の発症・進展を抑制することであり、本研究では PHD 阻害薬の糖尿病性腎臓病（diabetic kidney disease : DKD）への影響についても検討した。DKD では、低酸素が病態の進展に重要な役割をはたすことが知られている。

HIF は細胞を低酸素環境に適応させるために必要な遺伝子を誘導することが多く、PHD 阻害薬は代謝改善とは独立した腎保護作用を持つ可能性がある。しかし、DKD における HIF 活性化の有用性については相反する報告がなされており、HIF が線維化を促進する可能性も懸念されているため、PHD 阻害薬の長期投与が DKD に与える影響について明らかにすることは重要であると考えた。

BTBR *ob/ob* マウスはレプチンを欠損し、過食のため著明な肥満と高血糖を来し、8週齢ですでにアルブミン尿を呈するようになる。BTBR *ob/ob* 雄マウスに、4週齢から22週齢まで PHD 阻害薬を混餌投与し、下記の結果を得た。(1) PHD 阻害薬投与群では血中エリスロポエチン濃度と Hct が有意に上昇し、腎臓における HIF 活性化が示唆された。(2) 摂餌量は両群で同等だったにもかかわらず、PHD 阻害薬投与群では、vehicle 群と比較して体重増加が有意に抑制された。(3) PHD 阻害薬投与群では、8週齢と12週齢の空腹時血糖が vehicle 群と比較して低く、22週齢の HbA1c も有意に改善していた。一方、22週齢の血中インスリン濃度は PHD 阻害薬投与群で有意に低下しており、PHD 阻害薬によるインスリン抵抗性改善が示唆された。(4) 22週齢での血中総コレステロールは PHD 阻害薬投与群で有意に低下し、血中アディポネクチンは有意に上昇していた。中性脂肪は両群で同等だった。(5) 精巣上体白色脂肪組織 (white adipose tissue : WAT) の重量は、PHD 阻害薬投与群で有意に低下しており、個々の脂肪細胞も小さい傾向にあった。(6) PHD 阻害薬投与群ではアルブミン尿が有意に減少していたが、糸球体濾過量に変化はなかった。電顕像では、PHD 阻害薬投与群でポドサイトおよび糸球体内皮細胞の障害が軽減していた。

次に、糖と脂質代謝改善のメカニズムを検討するため、WAT における代謝関連酵素の発現を real-time qPCR で確認したが、pyruvate dehydrogenase kinase 1 や lactate dehydrogenase など、HIF のターゲット遺伝子として知られる酵素においても、PHD 阻害薬による発現変化は見られなかった。これは、PHD 阻害薬が腎臓や肝臓と比較して、脂肪組織に分布しにくいためと

考えられた。一方、PHD 阻害薬投与群では、WAT へのマクロファージ浸潤や、TNF- α などのサイトカイン発現が抑制されており、脂肪組織における慢性炎症の軽減が、インスリン抵抗性改善に寄与した可能性がある。また、肝臓における代謝関連酵素の発現を real-time qPCR で確認したところ、PHD 阻害薬投与群では 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) 還元酵素の分解を促進する *insulin-induced gene 2* の発現が上昇しており、血中総コレステロールを低下させるメカニズムの一つと考えられた。

PHD 阻害薬投与群では、糖と脂質代謝改善により、アルブミン尿の減少や、ポドサイトおよび糸球体内皮細胞障害の軽減が見られた。BTBR *ob/ob* マウスは、低酸素が最も深く関与する尿細管間質病変が軽度なこともあり、本モデルで PHD 阻害薬の直接的な腎保護作用について検討することは困難だった。しかし、HIF 活性化で危惧される腎間質線維化の悪化は見られず、18 週間の PHD 阻害薬投与による明らかな副作用は認められなかった。

以上より、PHD 阻害薬は 2 型糖尿病の新たな治療戦略となる可能性があると考えられた。PHD 阻害薬投与群ではアルブミン尿が減少したが、腎不全への進展抑制効果については、今後さらに検討する必要がある。