

本論文はリン過剰摂取がデュシェンヌ型筋ジストロフィー（Duchenne muscular dystrophy, DMD）の症状に与える影響を DMD の疾患モデル動物である mdx マウスを用いて研究したものである。mdx マウスはヒトの DMD と同様、骨格筋の細胞死や変性、炎症を呈する。病気の原因は骨格筋や心筋で発現する細胞膜裏打ちタンパク質ジストロフィンの欠損による筋細胞膜の脆弱性が増し、機械的刺激に対する抵抗性が弱いため、筋肉運動により次第に細胞膜が破壊されることにより生じると考えられている。近年、筋変性に伴う炎症の拡大が DMD の骨格筋症状を重篤化すること、並びに炎症を抑制すると筋症状が改善することが報告されている。一方、現代人の食生活ではリン過剰摂取が問題視されている。本研究では、リンの過剰摂取による筋変性の重篤化とリン吸着薬による筋変性の軽減化を示し、リン摂取と腎機能、筋変性に密接な関係があることを示している。

研究 1 ではまず、mdx マウスの筋病理的特徴である異所的石灰化のメカニズムについて述べている。透過型電子顕微鏡を用いて、様々な週齢と筋部位を観察し、初期のリン酸カルシウムの沈着は変性した筋線維内のミトコンドリアなどに起こり、それらを変性タンパク質とともにマクロファージが貪食し、細胞死を起こすことで巨大な異所的石灰化として骨格筋に留まることを認めた。次に、正常対照マウスと mdx マウスにリン含有量を変えた飼料を与え、その骨格筋変性に与える影響を検討した。離乳直後から最長 90 日齢までリンを過剰摂取させると、mdx マウスの筋変性と炎症が有意に増加することを示し、PT-PCR 法により、リン過剰摂取した mdx マウスの骨格筋では炎症マーカーである TNF- α や IL-17 が亢進しており、さらに骨化マーカーの 1 つである RANKL が亢進していたことから、リン過剰摂取によって筋変性と炎症、さらに異所的石灰化が増加していることが支持されている。また、マウス筋芽細胞株である C2C12 を用いた実験では、分化させた筋線維が添加するリン酸濃度依存的に筋分化が抑制され、壊死することを見出した。さらに正常対照マウスの骨格筋にリン酸を注射すると、リン酸濃度依存的に筋再生領域とマクロファージの浸潤領域が増加したことからも、リンが骨格筋に対して細胞毒性を有することを示唆している。リン過剰摂取した mdx マウスの骨格筋ではマクロファージの浸潤が増加していたが、これらの大半が炎症性マクロファージであ

ることを見出した。炎症性マクロファージは骨格筋の炎症を悪化させることが報告されており、さらに筋再生を助長することが明らかとなっている抗炎症性マクロファージの占める割合は減少した。このことから、リン過剰摂取により、炎症性マクロファージが亢進することで DMD 症状の重篤化が引き起こされると考えられる。一方で、リン摂取制限をさせた mdx マウスではこれらの DMD 症状の進行が抑制されることを明らかにした。特に、抗炎症性マクロファージが占める割合が増加しており、筋変性拡大を抑制したと言える。リン摂取制限した mdx マウスは、骨格筋が壊死し再生した指標となる中心核を有する筋線維数が有意に減少していたことから、これらの結果が支持された。臨床応用を考慮し、リン吸着薬（塩酸セベラマー）によってもリン摂取制限と同様の効果が得られるかを検討したところ、少量のリン吸着薬で骨格筋変性が抑制されたことから、今後十分に臨床応用が可能だと考えられる。

研究 2 では、リン過剰摂取が mdx マウスの骨密度や骨代謝に与える影響を調べるため、X 線 μ CT スキャナーを用いて脛骨の骨密度測定と骨形態計測を行った。その結果、先行研究と同様に mdx マウスは正常対照マウスと比べて骨密度が有意に低下していた。リン過剰摂取によって正常対照マウスでも骨密度が低下したが、mdx マウスではさらに重篤化することを明らかにした。特に骨密度だけでなく骨形態も変化していたことから骨粗鬆症に陥ることが示された。血中の骨形成マーカー（BALP）と骨吸収マーカー（CTx）を測定した結果、mdx マウスは骨吸収が亢進しており、リン過剰摂取によって骨形成が有意に減少することを明らかにした。リン過剰摂取では骨からカルシウムが溶け出すことで骨密度が低下するが、mdx マウスではさらにリン過剰摂取によって筋変性が悪化することで運動頻度が低下することが明らかとなり、骨へのストレスが減少する低回転性骨粗鬆症を引き起こすことが明らかとなった。

研究 3 では、リン過剰摂取と筋変性悪化の関係を明らかにするため、mdx マウスのリン代謝を調べた。血中生化学解析によって、mdx マウスはリン調整因子である FGF-23 や PTH が有意に増加しており、リン代謝が亢進していることが明らかとなった。一方、リン過剰摂取によって FGF-23 と PTH が亢進するにも関わらず、mdx マウスは血中リン酸濃度が有意に増加し、高リン酸血症を引き起こすことが明らかとなった。腎臓でのリン代謝因子の発現を調べたところ、代表的なリン代謝因子である klotho, NaPi 2a, NaPi 2c の発現は正常対照マウスと mdx マウスで差はなく、リン過剰摂取によってそれらの発

現は同様に低下した。しかし、筋肉量や運動の有無に影響を受けない腎機能マーカーである血中 cystatin C 濃度を測定した結果、mdx マウスでは有意に増加していることを見出した。この結果、mdx マウスは腎機能が低下していることが見出された。腎代謝機能が低下していることを証明するため小型動物用 X 線 μ CT スキャナーと造影剤を用いて、腎臓での造影剤代謝機能を測定した。尚、マウスなどの小動物に対するこの腎機能評価方法は本論文提出者が日立アロカメディカルと共同研究を行い、確立している。その結果、mdx マウスは正常対照マウスと比べて腎代謝速度が遅いことが明らかとなった。これらの結果から、本論文では mdx マウスの腎機能が低下していることを初めて明らかにした。さらに mdx マウスの腎機能低下は、高カルシウム血症のため尿量が増加しており、そのことが引き金となって脱水症状を起こしていることが寄与していることが分かった。最後に、腎機能低下が骨格筋に与える影響を調べるため、腎毒性を持つシスプラチンを投与した正常対照マウスの骨格筋に、蛇毒を用いて人為的に筋変性を起こした。その結果、腎障害を引き起こしたマウスでは 7 日後に筋再生の遅延と異所的石灰化が起こる事が分かった。以上の結果から、mdx マウスの骨格筋変性と異所的石灰化には、腎機能低下が関与していることが明らかとなった。また、腎機能低下が筋変性に影響を及ぼすことを示したのは、本論文が最初である。

本論文は、リン過剰摂取が mdx マウスの骨格筋変性を悪化させることを証明した興味深い研究といえる。特に、リンが骨格筋内の炎症を亢進させる要因であることを明確に示しており、対照的にリン摂取制限やリン吸着薬投与が骨格筋保護につながる補完治療であることを述べている。この研究は、未だ治療法が確立されていない DMD にとって、今すぐにでも実現可能な食事療法を発見した重要な論文である。さらに、腎機能低下が骨格筋変性の炎症拡大につながることを示した。本審査委員会では、本研究は学術的意義が高く、しかもリン摂取制限による臨床応用の道を示した点で高く評価できるものであり、和田 英治は博士(学術)の学位を授与するにふさわしいものと認定した。