

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	加藤 壮太
論文題目	Studies on the anemia-improving effect of prolyl hydroxylase inhibitors (Prolyl hydroxylase阻害剤による貧血改善作用に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>日本における透析患者は34万人を超え、透析の前段階である慢性腎臓病患者数は1330万人とされる。透析患者の原疾患としては糖尿病性腎症と高血圧により発症する腎硬化症が上位を占める。日本人では血圧に関連する食塩摂取量が伝統的に多いことから、腎不全の原疾患に食事が与える影響が大きいことが推察される。腎臓病になると、腎臓で産生される造血ホルモンであるerythropoietin (EPO) が不足し、腎性貧血を発症する。腎性貧血治療薬としては、従来、組換えヒトEPO (rhEPO) が使用されていたが、新たにprolyl hydroxylase (PHD) 阻害剤が導入されている。PHD阻害剤は、PHDが触媒するhypoxia inducible factor 1および2 alpha (HIF1/2<math>\alpha</math>) の水酸化を抑制することで、転写因子であるHIF1/2<math>\alpha</math>を活性化し、HIF1/2<math>\alpha</math>下流の血管新生、EPOや鉄代謝に関わる遺伝子の発現を誘導する。また、各種遺伝子改変動物の表現型解析より、HIF2<math>\alpha</math>/PHD系の調節により、腎臓のみならず肝臓においてもEPO産生が増加することが知られている。本論文では、新規PHD阻害剤としてTP0463518 (2-[[1-[[6-(4-chlorophenoxy)pyridin-3-yl]methyl]-4-hydroxy-6-oxo-2,3-dihydropyridine-5-carbonyl]amino]acetic acid)を開発し、その標的臓器について詳細な検討を行っている。また、既知のPHD阻害剤であるdimethyl-oxaloylglycine (DMOG)を高血圧モデル動物に投与し、血圧および腎症への影響をrhEPOと比較し、腎性貧血治療へのPHD阻害剤の優位性を明らかにしている。</p> <p>第1章では、PHD阻害剤に共通の構造としてグリシンアミドに着目し、多くの化合物から、<i>in vitro</i>でのPHD阻害活性、<i>in vivo</i>でのEPO誘導活性、尿中への排泄が少ないという特性に基づいてスクリーニングが行われ、TP0463518が見いだされた。その阻害活性はヒト、サルおよびラットのPHDを用いて詳細に明らかにされた。HIF1<math>\alpha</math>を基質としたヒト、サルおよびラットPHD2に対するIC<sub>50</sub>はそれぞれ13 nM、22 nM、18 nMであった。TP0463518の濃度に応じてK<sub>m</sub>値が増大することから、拮抗阻害型であることが示された。K<sub>i</sub>値は5.3 nMと算出された。代謝されずに尿へ排泄される率はラットで0.1%、イヌで15.2%だった。健常な動物 (マウス、サル、ラット) および5/6腎切除した貧血ラットへのTP0463518投与により、投与量に応じてEPOが産生されることが明らかにされた。</p> <p>第2章では、TP0463518が作用してEPO産生が起こる部位として、腎臓および肝臓でのHIF2<math>\alpha</math>タンパク質とEPO のmRNA量を測定し、既知のPHD阻害剤であるDMOGの作用と比較された。TP0463518は、腎臓に対してEPO産生を増す効果をわずかしき示さなかったが、通常殆どEPOを産生していない肝臓ではそのmRNA産生は1300倍と顕著に増大された。臓器中の全mRNA量は、肝臓において腎臓中EPO mRNA量の0.29倍に過ぎなかったが、TP0463518投与により、腎臓中の全EPO mRNA量の18倍に達した。また両腎臓を摘出したラットでは血中EPO濃度は検出限界以下まで低下したが、</p>			

TP0463518投与により、偽手術群での18 pg/mLよりも高い28 pg/mLまで増加した。これらの結果から、TP0463518とDMOGは主として肝臓に作用してEPOを産生し、これが血中に分泌されていることが明らかにされた。さらに、5/6腎切除により貧血を発症したラットにTP0463518を投与すると、用量依存的に網状赤血球数とヘモグロビン濃度を増加させ、貧血を寛解させることが示された。

第3章では、peptidoglycan-polysaccharide (PG-PS)で炎症性貧血を起こしたラットにTP0463518を投与し、ヘマトクリット値、鉄代謝、肝炎症へのその効果を検討した。肝臓での炎症は血中で利用できる鉄の量を減少させ、機能的な鉄欠乏貧血を起こす(炎症性貧血)。PG-PS投与によりラットのヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数は減少するが、TP0463518投与群はいずれもvehicle投与群よりも高い値を示し、貧血からの回復を促進していることが示された。また同様に、赤芽球数も高く維持されることはEPOの作用と考えられ、ベースラインの平均赤血球容積との差がTP0463518群で大きいことはより多くの鉄が利用されていることを示している。血漿鉄量、トランスフェリン飽和など、血中鉄指標に効果はなかったが、鉄の吸収に関与するdCYTbとDMT-1のタンパク質レベルおよびそれらのmRNAレベルは十二指腸で有意な増大を示し、鉄代謝の改善に寄与することが示された。肝臓での炎症関連遺伝子の発現については、影響は見られなかった。

第4章では、高食塩誘導性高血圧ラットにおけるrhEPOとDMOGの腎症に対する作用の比較が行われた。高食塩負荷により高血圧を発症するDahl Sラット、すなわち血管機能が低下している高血圧モデル動物へrhEPOを投与すると、高血圧、タンパク尿を呈し、糸球体硬化、腎髄質および尿細管間質の線維化が増悪した。一方、DMOG投与ではこれらの症状が抑制され、600 mg/kg体重 DMOG投与群では尿細管へのタンパク質の漏出がほぼ完全に抑制された。腎臓中の炎症マーカータンパク質(interleukin 1 $\beta$ およびmonocyte chemotactic protein 1)は高食塩負荷で増大したが、rhEPO投与は影響を及ぼさなかった。DMOG投与群ではその増加が抑制された。また、線維化促進作用を有するtransforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)はrhEPO投与により腎皮質と髄質の両方でより増加したが、DMOG投与はその増加を抑制した。腎保護作用を有するvascular endothelial growth factor (VEGF) タンパク質は高食塩負荷で著しく減少した。rhEPOはVEGF低下に影響しなかったが、DMOGは600 mg/kg投与によりvehicle投与群に比して腎皮質で7倍、髄質で60倍に増加させた。これらの知見から、高血圧を併発する腎性貧血患者の安全な治療にPHD阻害剤がrhEPOより適していることが示された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

日本での糖尿病や高血圧の蔓延は、腎臓障害を引き起こす可能性が高く、実際に人工透析治療に至った患者の原疾患として糖尿病性腎症と高血圧による腎硬化症が上位を占める。高血圧に関しては食塩摂取過剰がその原因となる場合が日本では多いと推察されるが、その摂取の抑制はうまく進んでいない。腎臓病はここで産生される造血ホルモン erythropoietin (EPO) の不足を引き起こし、腎性貧血を発症する。このように、腎疾患に原因がある貧血は、糖尿病や高血圧の発症など、栄養学的なコントロールの不調が遠因となる場合があり、栄養学・食品学の関与が求められる部分がある。

貧血の治療にEPOを投与することは造血に直結する手段であるが、副作用として高血圧やタンパク尿など腎臓の状態を悪化させることも報告されており、血管機能が低下している患者への投与は回避される。この問題を解決する手段として、転写因子HIF2 $\alpha$ を活性化し、下流のEPOや鉄代謝関連遺伝子の発現を誘導し得る prolyl hydroxylase (PHD) 阻害剤が治療に導入されてきている。本論文では、新たなPHD阻害剤としてTP0463518を開発し、これが肝臓でのEPO発現を強力に誘導すること、および肝臓を標的とするPHD阻害剤はEPOに比して腎臓への悪影響が見られず、高血圧を併発する腎性貧血患者の治療に適していることが見いだされた。評価すべき点は以下のように要約される。

1. 新規PHD阻害物質であるTP0463518は、肝臓特異的にHIF2 $\alpha$ を安定化し、EPOを誘導することを見いだした。さらにTP0463518に誘導された肝臓由来のEPOは貧血を改善することを見いだした。
2. TP0463518は、小腸での鉄吸収関連タンパク質発現を誘導し、健全な造血によって貧血の改善に資することを見いだした。
3. 高食塩食を負荷したDahl S ラットに組換えヒト (rh)EPOと既知のPHD阻害剤であるdimethyl-oxaloylglycine (DMOG)を造血作用が同程度となるように投与した場合、rhEPOはTGF- $\beta$ 1の増加と関連する高血圧、タンパク尿および腎臓の線維化を増悪させる一方、DMOGはVEGFの発現誘導を介してこれらの症状の進展を抑制することを見いだした。

以上のように、本論文は、高血圧を併発する貧血の治療において、新規PHD阻害剤を開発し、その酵素学的特性を明らかにし、肝臓でのEPO発現増大によって貧血治療薬として利用が期待できる物質であること、および肝臓を標的とするPHD阻害剤が腎臓への悪影響がなく、上記の貧血治療の標的として適切であることを明らかにしたことから、食品生理機能学、酵素化学、糖尿病腎臓内科学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和4年2月18日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）