

氏名(本籍)	ほり え まさ き 堀 江 正 樹 (東京都)			
学位の種類	博 士 (学 術)			
学位記番号	博 甲 第 5870 号			
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	経口貧血改善薬を用いたエリスロポエチン遺伝子ドーピングに対する生体内バイオマーカーを用いた検査方法の開発			
主査	筑波大学教授	医学博士	徳 山 薫 平	
副査	筑波大学教授	医学博士	正 田 純 一	
副査	筑波大学講師	博士(体育科学)	前 田 清 司	
副査	お茶の水女子大学准教授	博士(医学)	飯 田 薫 子	

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

近年開発された新規貧血改善薬、K-11706・FG-2216による持久力向上を目的としたEPO遺伝子ドーピングに対する生体内バイオマーカーを用いた検出方法の開発および、高感度・簡易的な新規造血物質の評価・スクリーニング方法を開発するために下記の3つの研究課題を設定し検討を行った。

課題研究 1-1：経口貧血改善薬反応性遺伝子の網羅的解析と薬剤使用検出バイオマーカーとしての有効性の検討。

課題研究 1-2：血漿プロテオーム解析を用いた経口貧血改善薬反応性タンパク質の探索とタンパク質バイオマーカーの有効性の検討。

課題研究 2： $\beta$ -globin LCR luciferase (*Hbb-LCR-Luc*) トランスジェニックマウスを用いた造血シグナルの解析とドーピング物質検出への応用性の検討。

### (方法)

課題研究 1-1：マウスを対照群・K-11706投与群・FG-2216投与群、陽性対照群として、低酸素曝露群・rhEpo投与群の5群に分類し、DNAマイクロアレイを用いて骨髄細胞での遺伝子発現の網羅的解析を行い各群での遺伝子発現を比較検討した。さらに、DNAマイクロアレイ解析の結果をもとに、いくつかの遺伝子に対して定量的RT-PCR解析を行い、各群での遺伝子発現量を定量した。

課題研究 1-2：マウスを対照群・K-11706投与群に分類し、血漿プロテオーム解析によりK-11706投与特異的に血漿内存在量が変動するタンパク質を網羅的に解析した。さらに、同定されたタンパク質の中からいくつかのタンパク質に対して、ウエスタンブロッティング(WB)法を用いて、陽性対照群との比較を含めたバリデーション解析を行った。

課題研究 2：*Hbb-LCR-Luc* トランスジェニックマウスと*in vivo* imaging systemを用いて、K-11706投与群・FG-2216投与群・低酸素(13.6%O<sub>2</sub>)曝露群、3群での $\beta$ -globin発現を非侵襲的に解析した。

## (結果)

課題研究 1-1 : DNA マイクロアレイ解析の結果、K-11706 群単独で 217 個、FG-2216 群単独で 309 個の遺伝子の有意な発現変動を確認した。さらに、定量的 RT-PCR 解析結果より、FG-2216 投与によって Oncostatin M (*Osm*) の発現が、K-11706 投与群では Lactoperoxidase (*Lpo*) 遺伝子の発現が対照群・陽性対照群と比較して有意に変動することを確認した。

課題研究 1-2 : 血漿プロテオーム解析の結果、K-11706 投与特異的に血漿内存在量に変動する 41 のタンパク質バンドおよびスポットを確認し、すべてのバンド・スポットにおいてタンパク質を同定することに成功した。さらに、WB 法を用いたバリデーションの結果から Fetuin-B が、陽性対照群との比較においても K-11706 投与特異的に有意に増加することが確認された。

課題研究 2 : K-11706 投与では、投与開始と共に  $\beta$ -globin 発現の増加傾向が認められた。FG-2216 投与では、投与開始と共に  $\beta$ -globin の有意な発現増加が認められた。低酸素曝では暴露開始後、 $\beta$ -globin の発現増加傾向が認められた。

## (結語)

課題研究 1 : 課題研究 1-1、1-2 の結果より、経口貧血改善薬を用いた EPO 遺伝子ドーピングに対するドーピング検査方法として、生体内バイオマーカーを用いた検査方法が確立できる可能性を示した。

課題研究 2 : *in vivo* imaging system を用いた *Hbb-LCR-Luc* トランスジェニックの解析より、本解析が微小な造血効果も鋭敏にとらえることが可能であることを示し、*Hbb-LCR-Luc* Tg マウスを用いた造血シグナル解析の有効性をおよび造血促進効果を持つ物質のスクリーニングへの応用性を示唆した。

## 審査の結果の要旨

本学位論文は、研究課題 1 として、EPO 遺伝子の賦活化を誘導する新規貧血改善薬の K-11706 や FG-2216 を用いた遺伝子ドーピングに対して、鋭敏な生体内バイオマーカーを用いた検出方法の開発を目指したものである。また、課題 2 では、新規造血物質の投与によるドーピングに対して、高感度であり簡易的な評価系の構築とスクリーニング方法の確立を目指したものである。スポーツ医学の研究分野において、分子生物学およびプロテオーム解析の手法を導入し、質の高い研究を遂行している。本研究の成果は、今後のドーピング検査の発展において十分に貢献出来る基礎データとなるものと確信している。

よって、著者は博士(学術)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。