

氏名	吉田 保子		
学位の種類	博士（スポーツ医学）		
学位記番号	博甲第	8668	号
学位授与年月	平成	30年	3月 23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	Studies on fluctuation of renalase in blood, organs, and skeletal muscle during exercise. (レナラーゼの運動時における血中、臓器、および骨格筋の 変動に関する研究)		
主査	筑波大学教授	博士（体育科学）	前田 清司
副査	筑波大学教授	医学博士	大森 肇
副査	筑波大学教授	医学博士	久賀 圭祐
副査	筑波大学教授	博士（医学）	竹越 一博

論文の内容の要旨

吉田保子氏の博士学位論文は、運動時におけるレナラーゼの変動を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

（目的）

レナラーゼは、2005年に発見されたフラビンアデニンジヌクレオチド依存性の可溶性モノアミンオキシダーゼである。主に腎臓で発現するが、心臓、肝臓、肺、そして骨格筋などで発現が確認されている。主な機能は、循環カテコールアミンを代謝することによって、心機能および全身血圧の制御に関与する機能と、生存および成長因子としての細胞保護機能である。

運動がレナラーゼに関与する可能性を示した論文（Tohoku J Exp Med）が2013年に報告されているが1編のみである。そこで著者は運動とレナラーゼの関係を検証することを研究目的としている。

（対象と方法、および結果）

1. ヒト対象走行試験

対象者は、週に10-20 km程度の走行トレーニングを継続的に行っている若年男性11名であった。総走行距離は30 kmであり、測定は走行前、走行10 km後、20 km後、30 km後の4ポイントにておこなった。走行速度は、90%換気性作業閾値とした。

血清レナラーゼ濃度は、反復測定による一元配置分散分析にて有意差を示した（ $P = 0.007$ ）。また、腎機能の評価のため推定糸球体濾過率を算出し、血清レナラーゼ濃度との関係をピアソンの積率相関係数より求めたところ、有意な負の相関が認められた（ $r = -0.479$ ）。また著者は酸化ストレスの評価の

ため、2-チオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) を測定している。血清レナラーゼ濃度と TBARS との関係は、走行前から走行 10km 後、20km 後でスピアマンの順位相関係数より、有意な正の相関が認められた ($r = 0.607$, $r = 0.467$)。本試験により、著者は運動による血清レナラーゼ濃度の増加を検証することができ、またレナラーゼレベルは腎機能、酸化ストレスと関連することも示している。

2. 動物モデル走行試験

著者は、10 週齢の雄性 Wistar ラットにて、レナラーゼレベル増加のメカニズムを解明するための試験をおこなっている。運動負荷は、ヒト対象走行試験と同等の中等強度とした。予備飼育後、走行学習を行い、コントロール群 (COT 群) と中強度運動群 (MEX 群) の 2 群に分けた。15 分の休息後、COT 群は麻酔下で屠殺した。MEX 群はトレッドミルにて 20m/分の速度にて 60 分間の運動負荷を実施直後に、麻酔下で屠殺した。解剖後、骨格筋 (ヒラメ筋、足底筋、長趾伸筋)、腎臓、心臓、肝臓、肺および血漿を収集し、 -80°C にて保存した。

分析の結果、血液中のレナラーゼ濃度は、ヒト対象試験と同様に COT 群と比較して MEX 群で、有意に増加した ($P = 0.047$)。逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法 (RT-PCR) にて mRNA によるレナラーゼの発現を確認した。補正にはグリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素 GAPDH を使用し、解析は検量線法にておこなった。心臓、肝臓、肺は両群で有意な差は認められなかった。腎臓は MEX 群で有意に減少した ($P = 0.040$)。骨格筋は、長趾伸筋のみが、MEX 群で有意に増加した ($P = 0.041$)。また、ウエスタンブロット法においてレナラーゼのタンパク質発現を確認した。内部標準には GAPDH を使用した。腎臓におけるレナラーゼのタンパク質の発現は、MEX 群で有意に低下した ($P = 0.012$)。また骨格筋は足底筋のみが、MEX 群で有意な増加が認められた ($P = 0.014$)。本試験により、著者は運動により腎臓のレナラーゼ発現が低下し、骨格筋のレナラーゼ発現が増加することを示している。

3. 細胞培養実験

著者は、運動負荷によるレナラーゼレベルの増加の要因の一つとして、カテコールアミンの増加が関与しているのではないかと仮説を立て、細胞実験にてカテコールアミンの一種であるエピネフリンの添加によるレナラーゼ遺伝子発現を検証している。マウス由来骨格筋細胞 (C2C12 細胞) を筋芽細胞から筋管細胞に分化させ、エピネフリン添加試験をおこない、RT-PCR にて mRNA のレナラーゼの発現を確認した。補正には GAPDH を使用し、比較 CT 法にて解析した。

その結果、エピネフリン濃度 10^{-5}g/L 、添加時間 30 分にて、レナラーゼ発現が有意に増加した。本試験により、著者は骨格筋細胞において、カテコールアミンによりレナラーゼの発現が増加することを示している。

4. 発現因子実験

著者は、細胞実験にてエピネフリンの添加により骨格筋細胞のレナラーゼ発現が増加することを確認したので、動物モデル試験における骨格筋においてもカテコールアミンが関与しているか否かを検証している。先行論文で、ヒト肝細胞等にて、エピネフリン関与のレナラーゼ遺伝子発現の調節には「STAT3」、「Sp1」、「ZBP89」転写因子が重要な役割を果たすことが報告されている (Biochemistry, 2014)。本実験では骨格筋内の「STAT3」、「SP1」、「ZBP89」の各 mRNA を RT-PCR にて測定し、比較 CT 法にて解析した。

その結果、骨格筋であるヒラメ筋において、すべての mRNA が COT 群と比較して MEX 群で有意に増加した (STAT3 : $P = 0.034$, Sp1 : $P = 0.049$, ZBP89 : $P = 0.040$)。この試験により、著者は骨格筋のレナラーゼの発現にカテコールアミンが関与していることを示している。

(考察)

ヒトの走行試験、動物モデルの走行試験において、血中レナラーゼレベルは増加した。レナラーゼの主な発現器官である腎臓において、ヒトを対象にした走行試験では腎機能が低下し、動物モデルの試験ではレナラーゼ発現が低下した。一方、骨格筋でのレナラーゼ発現は増加した。このことから、運動によるレナラーゼレベルの増加に骨格筋でのレナラーゼ産生が関与することが示唆された。骨格筋におけるレナラーゼ産生のメカニズムの一要因として、カテコールアミンの関与を考え、実験をおこなったところ、骨格筋細胞にてエピネフリンの添加によりレナラーゼの発現が増加することが明らかになった。同様に動物モデル実験における骨格筋でも、カテコールアミンによるレナラーゼ遺伝子の調節因子「STAT3」「Sp1」「ZBP89」が増加していることを検証した。

しかし、骨格筋におけるレナラーゼ遺伝子発現はヒラメ筋 (赤筋優位)、足底筋、長趾伸筋 (白筋優位) で差異があった。カテコールアミンによるレナラーゼ遺伝子の調節因子が増加したのは、赤筋優位

であるヒラメ筋のみであったため、赤筋はカテコールアミンによりレナラーゼ発現が惹起されるが、白筋はレナラーゼのもう一つの機能である、細胞保護に関連する酸化ストレス等により惹起されるのではないかと著者は推察している。

レナラーゼは全身の血圧を制御する物質であり、細胞を保護する機能もあると報告されているため、著者は運動によりレナラーゼレベルが増加することは有用なことであり、またレナラーゼは運動、さらには運動療法の有用性を示唆する物質の一つであると述べている。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究は運動におけるレナラーゼレベルの変動について、ヒトを対象にした試験、動物モデルを用いた試験、細胞培養実験にて検証をおこなった。骨格筋とレナラーゼとの関連性を示した本研究は他に類を見ないものであり、高く評価できる。運動によりレナラーゼレベルが増加するという新知見は、レナラーゼが高血圧や他疾患等に関与するという観点から、運動療法の有用性のメカニズム解明に寄与すると考えられる。

平成30年1月18日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（スポーツ医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。