

|         |   |         |        |
|---------|---|---------|--------|
| 氏名      | 浅井 宏文   |         |        |
| 学位の種類   | 博 士 (生物科学)  |         |        |
| 学位記番号   | 博 甲 第 9 4 5 1 号   |         |        |
| 学位授与年月日 | 令和2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   | 生命環境科学研究科   |         |        |
| 学位論文題目  | The Role of Uremic Toxins in Renal Anemia<br>(尿毒症物質の腎性貧血への関与に関する研究) |         |        |
| 主査      | 筑波大学教授  | 博士 (理学) | 丹羽 隆介  |
| 副査      | 筑波大学准教授   | 博士 (理学) | 澤村 京一  |
| 副査      | 筑波大学教授  | 博士 (農学) | 三浦 謙治  |
| 副査      | 筑波大学教授  | 博士 (理学) | 中野 賢太郎 |

## 論 文 の 要 旨

本論文は、慢性腎臓病 (chronic kidney disease ; CKD) の患者で蓄積される尿毒症物質による造血に対する負の作用の分子メカニズムを報告したものである。

CKD 患者においては、腎機能の低下により、本来は尿に排泄される様々な代謝産物が「尿毒症物質」として体内に蓄積し、生体に悪影響を及ぼす。一方、腎性貧血は CKD 患者で高頻度に見られる合併症であり、その主因は骨髄での赤血球造血を促すホルモンであるエリスロポエチン (EPO) の成体腎臓での産生低下にあるとされる。健常人では、腎臓内の EPO 産生細胞が、低酸素応答性転写因子 Hypoxia-inducible factor (HIF) を介して生体の低酸素状態を感知し、EPO を産生する。一方、CKD 患者では、細胞内 HIF シグナルの障害などの理由で EPO 産生能が低下し、血液中の酸素濃度に見合った十分量の赤血球造血が起こらず貧血となる。EPO 産生能低下に至る要因としては、尿毒症物質の 1 つであるインドキシル硫酸 (IS) による HIF シグナルの抑制が報告されているが、その詳細な作用機序には不明な点が多く残されていた。また、IS 以外の尿毒症物質の EPO 産生への影響も未検討のままであった。そこで本研究において著者は、IS を含む尿毒症物質の EPO 産生への影響ならびにその作用機序を検討している。

論文第一部において著者は、低酸素誘発 EPO 産生に対する IS の作用の検討について報告している。著者は、低酸素に応答して EPO を産生するヒト肝臓癌細胞株 HepG2 細胞ならびに生体ラットを用いて、生理的濃度での IS の作用を検討した。著者は、検討したすべての IS 濃度において、HepG2 細胞内での EPO 遺伝子発現誘導が抑制されることを見出した。さらに著者は、20  $\mu$ M 以上の IS で低酸素誘発時の HIF 活性化が抑制されることを発見した。続いて著者は、EPO 産生を誘導する瀉血モデルラットを用いて、

ISの代謝前駆体であるインドールを単回強制経口投与した。その結果著者は、血漿中 EPO 濃度はインドール投与群で対照群と比較して有意に低くなることを観察した。以上の結果より著者は、*in vitro* および *in vivo* の両実験系において、IS は CKD 患者の血中濃度と同程度の濃度で低酸素誘発 HIF 活性化及び EPO 産生を抑制することが明らかになったと記載している。

先行研究において、IS は核内受容体 Aryl hydrocarbon receptor (AHR) のリガンドとして作用することが報告されている。これを受けて著者は、IS による HIF 活性化抑制への AHR の関与を検討した。著者は、HepG2 細胞において、20  $\mu$ M 以上の IS により AHR の核移行が促進され、さらに AHR の下流標的遺伝子 *CYP1A1* の転写が昂進することを見出した。さらに著者は、ラットでのインドールの単回強制経口投与により、肝臓と腎臓での *CYP1A1* 遺伝子発現増加、および肝細胞での AHR 核移行を確認した。さらに著者は、HepG2 細胞を用いて、低酸素誘発 HIF 活性化に対する IS の抑制作用は、AHR 機能を阻害することで完全にキャンセルされることも示した。以上の結果を受けて第一部において著者は、IS は AHR の活性化を介して低酸素誘発 HIF 活性化を抑制すると結論づけている。

論文第二部において著者は、IS 以外の尿毒症物質の低酸素誘発 EPO 産生に対する作用について検討している。著者は、IS 以外のタンパク結合性尿毒症物質として、インドキシルグルクロン酸 (IG) 、p-クレシル硫酸、フェニル硫酸、インドール酢酸、および馬尿酸の5物質を取り上げた。HepG2 細胞を用いた EPO 産生の検討の結果、著者は、IG 以外は顕著な効果を示さない一方で、IG は 100  $\mu$ M 以上の濃度において EPO 遺伝子発現を抑制することを発見した。さらに著者は、IG は CKD 患者の血中濃度と同程度である 10  $\mu$ M 以上の濃度で低酸素誘発 HIF 活性化を抑制した。次に著者は、IG の HIF 活性化抑制機序における AHR の関与を調べ、*CYP1A1* 遺伝子発現及び AHR 核移行の増加を観察した。さらに著者は、HepG2 細胞を用いて、低酸素誘発 HIF 活性化に対する IG の抑制作用は、AHR 機能を阻害することで完全にキャンセルされることも示した。これらの結果から第二部において著者は、IG の作用機序は、IS と同様に、AHR の活性化を介して低酸素誘発 HIF 活性化を抑制することにあると結論づけている。

論文の総合討論において著者は、今回の成果の基礎科学面での議論に加えて、本研究成果の医療面への貢献について述べている。腎性貧血の治療には、EPO を体外から補充する目的で、遺伝子組換えヒト EPO 製剤が用いられる。しかし著者は、投与量により CKD 合併症である心血管疾患のリスクが増加することや、注射剤しかなく高価であるなど多くの問題点が存在し、新たな治療法が求められていると主張する。本研究では、IS および IG が、CKD 患者の血中濃度と同程度の濃度で、AHR を介して低酸素誘発 HIF 転写活性化を抑制し、それにより EPO 産生を抑制することが明らかにされた。これらの結果から著者は、尿毒症物質による AHR の活性化を抑制することが腎性貧血の新たな治療法となる可能性を提示している。

## 審 査 の 要 旨

本研究で著者は、尿毒症物質が腎臓における EPO の転写阻害に密接に関連することを発見し、さらにその転写阻害が核内受容体 AHR を介したものであることを明らかにした。実験結果は、培養細胞と生体の両方において精緻に実施されており、得られた実験結果は著者の仮説や提案を強く支持するものになっている。また、本論文は、CKD の新たな治療戦略にも大いに示唆を与える内容となっており、基礎生物学のみならず医学に対しても大きな貢献をしていると評価できる。

令和2年1月27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に論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生物科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。