

氏名(本籍地)	原 百合恵(北海道)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	甲第78号
学位授与年月日	平成29年3月16日
学位授与の要件	昭和女子大学学位規則第5条第1項該当
論文題目	低酸素曝露がラットの糖質代謝に与える影響とクエン酸投与の有効性に関する研究
論文審査委員	(主査) 昭和女子大学教授 江崎 治 (副査) 昭和女子大学教授 海老沢 秀道 昭和女子大学教授 福島 正子 理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター 細胞機能評価研究チーム チームリーダー 片岡 洋祐

論文要旨

クエン酸は、疲労軽減効果が期待されており、低酸素状態になる慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者の疲労感軽減に繋がる有効な食品成分である可能性が高い。しかしこれを支持する科学的根拠は十分蓄積されているとは言えない。本研究では、通常のマウスやラットにクエン酸を投与した場合の代謝の変化、低酸素曝露したラットにクエン酸を投与した場合の代謝の変化を調べ、疲労感解消の機序として説明できるかをどうか検討した。

COPD患者では気流閉塞による低酸素状態により疲労感が生じ、身体活動性が低下する。低酸素条件下では、糖利用の亢進や炎症が誘導されると報告されており、これらがCOPD患者の疲労感の一因となっていると考えられる。一方、クエン酸には疲労軽減効果があると期待されており、クエン酸はCOPD患者の疲労感に対して有効な食品成分となり得る可能性がある。そこで本研究では、COPDの食事療法を確立するための基礎的知見を得ることを目的とし、低酸素曝露が糖質代謝に与える影響とクエン酸投与の有効性についてラットを用いて検討した。

第1章では、クエン酸の疲労軽減メカニズムを明らかにすることを目的とし、クエン酸投与が糖質代謝と炎症関連遺伝子発現に与える影響を、マウスの骨格筋と肝臓を用いて網羅的に解析した。第1節の骨格筋を用いた試験では、クエン酸投与による疲労軽減効果はTCA回路や電子伝達系の活性化によるものではなく、糖新生の亢進と炎症の抑制によるものである可能性が遺伝子発現レベルで示された。第2節の肝臓を用いた試験においても骨格筋での試験と同様に、クエン酸の投与はTCA回路や電子伝達系の遺伝子発現を増加さ

せなかったが、第1節と同様に糖新生を亢進する可能性が示された。以上より、クエン酸投与は糖新生を亢進させ炎症を抑制することにより、COPD患者の疲労感の軽減に寄与する可能性が示された。

第2章では、低酸素曝露の影響と低酸素曝露に対するクエン酸投与の有効性について、ラットの肝臓とヒラメ筋を用いて遺伝子発現レベルで明らかにすることを目的とした。第1章で明らかにされたクエン酸投与による糖新生亢進効果と炎症抑制効果のうちの糖新生に着目し、糖質代謝関連遺伝子発現について検討した。肝臓では、低酸素曝露は糖取込み、解糖系、糖新生を同時に亢進する可能性が示された。また、低酸素曝露により血中乳酸値が有意に低値を示したことから、乳酸が糖新生の基質として利用された可能性が示された。低酸素曝露に対するクエン酸投与の影響については、クエン酸投与により低酸素曝露によるGLUT1の上昇がさらに高められたが、その他の影響は殆どみられなかった。ヒラメ筋では、低酸素曝露によりPck1が有意に上昇したのみで、糖取込みや解糖系には影響がみられなかった。また、クエン酸投与も遺伝子発現を変化させなかった。本章の条件下では、ヒラメ筋は肝臓と比較して低酸素曝露の影響をあまり受けないことが示された。

第3章では、第1章および第2章において遺伝子発現レベルで得られた結果を代謝物レベルで検証することを目的として、低酸素曝露およびクエン酸投与がTCA回路内の代謝物と糖原性アミノ酸の血漿中濃度に及ぼす影響について、ラットを用いて検討した。その結果、クエン酸投与はTCA回路内の代謝物の血漿濃度を上昇させたが、この上昇は、セリンとグリシンから代謝されたピルビン酸の上昇により導かれたと推察された。また、クエン酸投与によりいくつかの糖原性アミノ酸が上昇しており、1章でみられたクエン酸による糖新生の亢進にはこれらのアミノ酸が関与している可能性も示された。低酸素曝露では、TCA回路内の代謝物であるコハク酸が有意に減少し、クエン酸は有意に増加していたが、それ以外の代謝物には有意な差はみられなかった。また、低酸素曝露はコハク酸やフマル酸に代謝されるいくつかの糖原性アミノ酸を有意に上昇させた。コハク酸とフマル酸はHIF-1 α の安定化に寄与することから、低酸素曝露による糖原性アミノ酸の上昇は、糖新生の基質として利用される可能性だけでなく、HIF-1 α の安定化に寄与する可能性が示された。低酸素曝露に対するクエン酸投与の直接的な有効性については、第3章においても示すことはできなかった。一方で、クエン酸投与は、疲労時に減少するTCA回路の初期段階の代謝物（クエン酸、シスアコニット酸、イソクエン酸）を増加させたことから、クエン酸はCOPD患者の疲労感を軽減する可能性が示された。

本論文では、「低酸素と疲労感」という新しい切り口で、COPDの食事療法を確立するための基礎的知見を得ることを目的として研究を実施した。本研究を通して、クエン酸投与や低酸素曝露が糖質代謝に与える様々な影響を、遺伝子発現レベルと代謝物レベルで明

らかにすることができた。これらの基礎的知見を踏まえ、今後、COPDをはじめとする呼吸器疾患の食事療法に関する研究が「低酸素」や「疲労感」といった新しい観点から行われ、多くの患者の OQL や ADL の向上に寄与できることを期待したい。

論文審査結果の要旨

低酸素曝露したラットにクエン酸を投与した場合の多くの代謝マーカーの変化を調べ、疲労感解消の機序として説明できるかをどうか検討した研究である。肝臓、筋肉での遺伝子発現量、血漿中の代謝産物のいくつかを調べた項目では、糖新生の増加、炎症関連遺伝子発現量の減少や血漿コハク酸量の増加と疲労感解消の関連性が示唆された。クエン酸投与によるこれらの変化は、新しい発見である。論文作成のため多くの実験をこなし、クエン酸投与による疲労感解消の可能性について、多くの討論がなされている。

低酸素曝露およびクエン酸投与が TCA 回路内の代謝物と糖原性アミノ酸に与える影響について、ラット血漿の LC-MS/MS 分析により検討した研究の結果は特に注目に値する。クエン酸投与により糖原性アミノ酸である serine, glycine, histidine, glutamine, isoleucine, methionine, phenylalanine の増加が認められ、糖新生の基質となる可能性が示唆された。更にこれらの糖原性アミノ酸の増加は、TCA 回路内の代謝物 citrate, cis-aconitate, isocitrate, alpha-ketoglutarate, fumarate, malate の増加を生じ、TCA 回路を亢進させることが推定された。一方、低酸素曝露では、TCA 回路内の代謝物である succinate や fumarate が減少することから、TCA 回路活性の低下が推定された。低酸素曝露による疲労感が TCA 回路の初期段階の代謝物が減少と関連するならば、クエン酸投与はこれらの代謝物を増加させていたことから、COPD 患者の疲労軽減に対するクエン酸の有効性が期待される。

審査員一同は、本申請論文に対して詳細な検討を加え、慎重に審議した。その結果、本論文は生活科学・生命科学分野における新知見を含む優れた論文であり、博士論文としてふさわしいと判断した。また申請者に対する質疑応答より、申請者が十分な学識を有すると判断した。以上より審査委員会は全員一致で、申請者を本論文による博士（学術）の学位授与に値すると判定した。