

課題番号 68

腎性貧血における赤血球造血因子エリスロポエチン産生不全の分子機序解明

[1] 組織

代表者：鈴木 教郎

(東北大学大学院医学系研究科)

対応者：関根 弘樹

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

中井 琢 (東北大学大学院医学系研究科)

研究費：消耗品費 20 万円

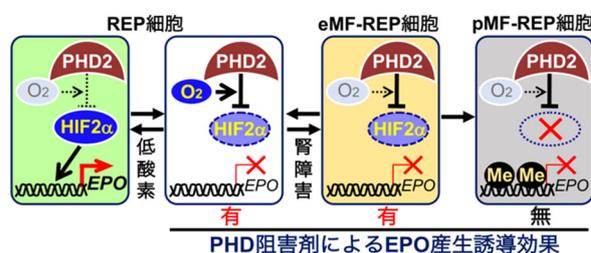
[2] 研究経過

現在、世界人口の1割以上が慢性腎臓病 (CKD) に罹患しているが、CKD の成因は遺伝的背景から生活習慣にわたって多様である。また、CKD の分子病態が複雑であるため、治療法が確立されていない。そのため、血液透析などの高額な対症療法に頼らざるを得ず、CKD は各国で医療費高騰の主な原因となっている。すなわち、CKD の分子病態解明は、国際的に喫緊の課題である。腎臓は老廃物を尿として排泄するだけでなく、血圧調節などに関わるホルモンを産生する役割を担う臓器であるが、申請者は、腎臓において赤血球造血因子エリスロポエチン (EPO) を分泌する間質線維芽細胞 (renal EPO producing cell: REP 細胞) が腎障害により筋線維芽細胞に形質転換することを示し、腎線維化の機序と可塑性を示してきた。また、形質転換した REP 細胞は EPO 産生能を喪失し、貧血発症の原因となることを明らかにした (Souma et al, *J Am Nephrol* 2013, 2016; Suzuki et al, *Haematologica* 2016, *Kidney Int* 2018(ほか))。

REP 細胞の性状解析は重要な研究課題であるが、REP 細胞の単離や解析が非常に困難であるうえに、適切な細胞株が樹立されていなかったため、進んでいなかった。申請者らは遺伝子改変マウスを駆使して、世界に先駆けて REP 細胞由来の細胞株「Replic 細胞」を樹立した (Sato et al, *Sci Rep* 2019)。Replic 細胞は筋線維芽細胞に形質転換した REP 細胞の特徴を有しており、EPO 産生能を喪失していた。そこで本研究では、Replic 細胞を活用して、腎障害による EPO 産生不全の分子基盤の解明を目標とした。本研究は REP

細胞形質転換機序の理解を大幅に進めることから、得られた知見を腎性貧血・腎線維化を含む CKD の分子病態解明に繋げることを目指して取り組んだ。

なお、本研究の開始前から参加メンバーは週1回の進捗確認を行っており、本研究期間中も継続的に研究打ち合わせを実施した。



REP細胞における低酸素誘導的EPO産生制御機構と病態における破綻のメカニズム

REP細胞ではPHD2-HIF2 α 経路を介して、EPO遺伝子発現が低酸素誘導性に制御される。腎障害によるREP細胞の筋線維芽細胞への形質転換は段階的に進行し、初期段階のeMF-REP細胞ではPHD2が異常活性化し、低酸素環境でもHIF2 α を抑制するためにEPO産生不全に陥る。形質転換が進行したpMF-REP細胞では、エピジェネティック制御系によりHIF2 α およびEPOの遺伝子領域が不活性化される。したがって、腎性貧血治療薬であるPHD阻害剤は、eMF-REP細胞のEPO産生を誘導し、薬効を示すが、pMF-REP細胞はEPO遺伝子発現誘導系が破綻しており、PHD阻害剤抵抗性を示す。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

Replic 細胞では EPO 遺伝子座ならびに EPO 発現誘導に必要な転写因子 HIF2 の遺伝子座が DNA メチル化によって発現抑制されており、EPO 産生不全の原因となっている (Sato et al, *Sci Rep* 2019, *Front Genet* 2019: 図)。一方、REP 細胞の筋線維芽細胞への形質転換は可逆的であり、腎環境の改善により筋線維芽細胞は REP 細胞の性質を回復することが申請者らの研究により明らかとなっていた (Souma et al, *J Am Nephrol* 2013, 成果資料 #2,3,5,6)。本研究では、筋線維芽細胞の性状を示す Replic 細胞に線維芽細胞の性状を回復させ、EPO 産生能を再活性化させる手法の確立を目指して、以下に示す研究成果を得た。

まず、Replic 細胞では、筋線維芽細胞への分化を特徴づける Calponin 1 および Tenascin C の遺伝子発現

が亢進していることを見出した。これらの遺伝子発現は、TGF シグナルの阻害剤によって低下した。これまでに Replic 細胞は細胞自律的に TGF シグナルが活性化していることを報告しており (Sato et al, *Sci Rep* 2019)、今回の結果から、TGF シグナルが REP 細胞の筋線維芽細胞への形質転換および分化を促進していることがわかった。また、マウス腎臓の解析から、REP 細胞は形質転換により昇圧因子レニンを産生し、高血圧を引き起こすことを明らかにしたが (#1)、Replic 細胞ではレニン産生が認められなかったことから、筋線維芽細胞でのレニン産生には組織圧や血流などの個体レベルの臓器環境が関与すると考えられた。

次に、Replic 細胞の EPO 遺伝子発現を再活性化するために、DNA メチル化阻害剤、TGF シグナル阻害剤、PHD 阻害剤の3剤を培地に添加した (#4)。その結果、これら3剤の同時投与では、HIF2 の遺伝子領域における DNA メチル化を解除することができず、EPO 遺伝子発現を誘導できないことが明らかとなった。本実験では、DNA メチル化の維持に対する阻害剤を用いたため、Replic 細胞における HIF2 および EPO の遺伝子領域の恒常的な新規 DNA メチル化を阻害できなかったことを確認した。また、Replic 細胞や線維化腎では新規 DNA メチル化酵素である DNMT3B の発現が亢進していた (#7-9)。さらに、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤が Replic 細胞の HIF2 発現を増大させることを見出した。この機序は不明であるが、Replic 細胞に特異的な現象であることを確認した。現在、筋線維芽細胞に EPO 産生能を回復させるための道筋を示す知見として、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による HIF2 発現誘導機序を解析している。

本研究の加齢医学研究所内対応者である関根弘樹講師は、DNA 修復や転写誘導に機能するポリ ADP リボシル化酵素 PARP1 が HIF2 の共役因子として EPO 遺伝子の転写活性化に寄与することを発見した。そこで、Replic 細胞への PARP1 活性化剤や過剰発現による EPO 遺伝子発現への影響を解析したが、PARP1 への介入では Replic 細胞の EPO 産生能が回復しないことがわかった。

(3-2) 波及効果と発展性など

腎性貧血は REP 細胞の筋線維芽細胞への形質転換に伴う EPO 産生不全によって発症するが、この形質転換は2段階で進行し、初期段階では PHD の異常活性化により EPO 産生が抑制される。本研究から、慢性期では、HIF2 のエピジェネティクスレベルでの不活性化が EPO 産生不全に大きく影響することが明らかとなった。2019 年から腎性貧血治療に対する PHD

阻害剤の利用が開始されたが、本研究の成果は、腎線維化が進行すると PHD 阻害剤による EPO 産生・赤血球造血誘導効果が減弱する機序を示した。また、DNA メチル化やヒストンアセチル化に関連した分子を創薬標的とすることが、進行した CKD における腎性貧血、ひいては腎線維化に対する治療法開発に有効であることを提唱することができた。

本研究で用いた Replic 細胞については、関根講師を介して、加齢医学研究所の医用細胞資源センターに寄託しており、国内外への供給準備が完了した。また、海外のライフサイエンス研究試薬の販売企業2社から販売の申し入れがあり、契約締結を進めている。

[4] 成果資料

- (1) Miyauchi K, Nakai T, Saito S, Yamamoto T, Sato K, Kato K, Nezu M, Miyazaki M, Ito S, Yamamoto M, Suzuki N. Renal interstitial fibroblasts coproduce erythropoietin and renin under anaemic conditions. *EBioMedicine* 64: 103209 (2021)
- (2) Yamazaki S, Hirano I, Kato K, Yamamoto M, Suzuki N. Defining the functionally sufficient regulatory region and liver-specific roles of the erythropoietin gene by transgene complementation. *Life Sci* 269: 119075 (2021)
- (3) Nezu M, Suzuki N. Nrf2 activation for kidney disease treatment—a mixed blessing? *Kidney Int* 99(1): 20-22 (2021)
- (4) Li L, Nakano D, Zhang A, Kittikuluth W, Morisawa N, Ohsaki H, Suzuki N, Yamamoto M, Nishiyama A. Effects of post-renal anemia treatment with the HIF-PHD inhibitor molidustat on adenine-induced renal anemia and kidney disease in mice. *J Pharmacol Sci* 144(4): 229-236 (2020)
- (5) Nezu M, Suzuki N. Roles of Nrf2 in protecting the kidney from oxidative damage. *Int J Mol Sci* 21: 2951 (2020)
- (6) 宮崎真理子, 宮内健一郎, 佐藤浩司, 鈴木教郎. 腎性貧血の発症機序. *臨床透析* 37:13-18 (2021)
- (7) 中井 琢, 鈴木教郎. 腎間質線維芽細胞による全身の酸素恒常性維持機構. *実験医学* 38(9): 1451-1457 (2020)
- (8) 鈴木教郎. 腎臓間質の線維芽細胞. *実験医学増刊号* 38 (12): 1975-1981 (2020)
- (9) 佐藤浩司, 鈴木教郎. 腎間質構成細胞の特徴と機能. *腎と透析* 89(3): 402-407 (2020)