

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08361

研究課題名(和文) エリスロポエチン遺伝子発現制御機構を利用した新規貧血改善薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel erythropoiesis-stimulating agents that enhance erythropoietin gene expression

研究代表者

平野 育生 (Hirano, Ikuo)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00708117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：現在エリスロポエチン(EPO)製剤は腎性貧血の治療などで広く用いられているが、薬価が高いことや経口投与が不可能であることなどから、内在性のEPO遺伝子の発現を誘導する薬剤の探索が世界的に進められている。

私はEPO遺伝子発現を誘導する薬剤のスクリーニングを行い候補化合物を複数同定した。その内のミトキサントロンおよび化合物Aは、マウス個体を用いた解析においても、薬剤投与により肺におけるEPO遺伝子の発現誘導が確認された。これらの薬剤は転写因子GATAによるEPO遺伝子の抑制性制御に作用しEPO遺伝子の発現を誘導すると考えられるが、その詳しい作用機序については今後の解析が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病などの腎障害では、腎EPO産生が障害されることで生じる腎性貧血が問題となっている。現在はEPO製剤を用いた治療が主に行われているが、薬価が高く血中への投与が必須であるため、経口投与が可能な造血誘導剤の開発が進められている。EPO遺伝子のレギュレーターである低酸素誘導性因子HIFの誘導剤が臨床試験が行われているが、すでに腎EPO産生細胞が高度に障害された状態ではこれらの薬剤の効果は限定的であると考えられる。本研究で同定されたミトキサントロンは本来EPO産生能を持たない細胞におけるEpo遺伝子の転写誘導効果が認められており、将来的に重度に腎臓が障害された患者にも効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Anemia of renal disease is mainly due to deficient erythropoietin (EPO) that produced from the kidney. Recombinant human EPO treatment is the first choice of treatment of the renal anemia, but rhEPOs are very expensive and need intravenous administration. Our purpose of this study was finding the seeds of new erythropoiesis-stimulating agents that was inexpensive and oral administrative. We established reporter cell lines using mouse kidney collecting duct derived cell line (mIMCD). We done high throughput screening with the drug libraries, and identified several compounds as seeds of new ESA. One of them, Compound-A showed inducing activity of EPO gene expression in vitro (mIMCD, A549 and TFK-1) and in vivo (mouse lung). It is reported that Epo gene expression is negatively regulated in some epithelial cells by transcription factor GATA. The Compound-A maybe affects GATA factor binding to GATA motif located on Epo promoter region and induce ectopic expression of Epo gene.

研究分野：血液学および血液腫瘍学の分子生物学

キーワード：Erythropoietin GATA Mitoxantrone ESA drug screening

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

EPO は赤血球造血に必須のホルモンであり、*EPO* 遺伝子破壊マウスは胎生期に貧血により致死となる。成体において EPO の主な産生臓器は腎臓であり、貧血時の血中 EPO の 80%以上が腎臓 EPO 産生細胞 (Renal EPO producing cells, REP 細胞) で産生される。そのため、慢性腎臓病などの腎障害時には腎臓 EPO 産生能の低下に伴い腎性貧血が生じる。また、悪性腫瘍においても、化学療法や放射線療法などの治療過程や病状の進行に伴い、重度の貧血を示すことが知られている。現在、これらの貧血症状に対してはリコンビナントヒト EPO 製剤 (rhEPO 製剤) の投与による赤血球造血の誘導が広くなされているが、rhEPO 製剤は薬価が高いことに加え、経口投与が困難であることや抗 EPO 抗体の出現などによる EPO 抵抗性貧血、rhEPO 製剤投与による悪性腫瘍の増殖促進が問題となっており、新規の造血促進薬 (ESA) の開発が世界的に進められている。EPO 遺伝子は低酸素応答性転写調節因子 (Hypoxia inducible factor, HIF) により転写が制御されている。HIF は通常酸素分圧下では PHD により水酸化され、プロテアソームにより分解される。現在の新規 ESA 開発の主流は FG-4592 (Roxadustat) などに代表される経口投与可能な PHD インヒビターの開発であるが、HIF 発現誘導薬は EPO 以外の HIF 標的遺伝子群も発現誘導するため、重篤な副作用の危険が示唆されている。

新規 ESA は、経口投与可能な小分子化合物であることや、その作用が造血誘導効果に特異的であり個体レベルで副作用の少ない薬剤であることが求められる。また、慢性腎臓病時には REP 細胞からの EPO 産生が障害されているため、肝臓などの REP 細胞以外の細胞からの EPO 産生を誘導する薬剤であることが望ましいが、現時点でこれらの条件を満たす有効な ESA は開発されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、EPO 非産生細胞を用いた EPO 誘導剤のスクリーニングを行うことで、HIF を介さない、かつ異所性に EPO 産生を誘導可能な新規 ESA を同定することである。

3. 研究の方法

- 腎臓 *Epo* 遺伝子制御領域以外の *Epo* 遺伝子制御領域下で GFP を発現するマウス (*dCURE-GFP*) の肝実質細胞を用いたスクリーニング系を樹立する。また、マウス腎集合管上皮細胞由来細胞株 mIMCD の *Epo* 遺伝子領域にレポーター遺伝子を挿入することでスクリーニング系を樹立する。

- 樹立したスクリーニング系を用い、東北大学薬学部化合物ライブラリー (6080 化合物) および東京大学創薬機構より提供された化合物コアライブラリー (9,600 化合物) を対象に HTS を実施し、*Epo* 遺伝子発現の誘導作用を示す化合物を同定する。

- 得られた化合物について *dCURE-GFP* マウスなどへの投与実験を行い、その効果および作用機序を解明する。

4. 研究成果

(1) HTS 系の樹立に際し、当初は *dCURE-GFP* マウス肝実質細胞やアストロサイトをを用いたスクリーニング系の樹立を想定していたが、事前の条件検討の結果、初代培養からの不死化や HTS として使用可能な細胞株の樹立はかなりの労力と時間が必要となることが予想された。そこで、スクリーニング系の樹立方法をマウス腎集合管上皮細胞由来細胞株 mIMCD およびヒト肺胞基底上皮腺癌由来細胞株 A549 などの既存の細胞株を用いた手法により行うこととし、その結果、期待通り mIMCD を用いた有効なスクリーニング系を樹立した。同スクリーニング系を用い、東北大学薬学部化合物ライブラリー内の 6080 個の化合物および東京大学創薬機構より提供された 9,600 化合物を対象に HTS を実施し、その結果、Mitoxantrone (MTX) や化合物 A、その他 20 種類のリード化合物を同定した。これらは既存の HIF 誘導剤のような EPO 産生細胞からの EPO 発現を誘導する薬剤ではなく、EPO 非産生細胞から EPO 発現を誘導可能な薬剤となる可能性があると考えられた。EPO 欠乏による貧血である腎性貧血は慢性腎臓病などの腎障害時において問題となるが、その原因は体内の主な EPO 産生細胞である REP 細胞が筋線維芽細胞へと形質転換してしまい EPO 産生能を失うことにある。同定した化合物は、元々の EPO 産生細胞がほとんど機能を

失ってしまった重度の腎障害患者においても、異所性に EPO を誘導することで造血効果を発揮する有効な薬剤となる可能性があるため、その作用および作用機序の詳細な解析を行うこととした。

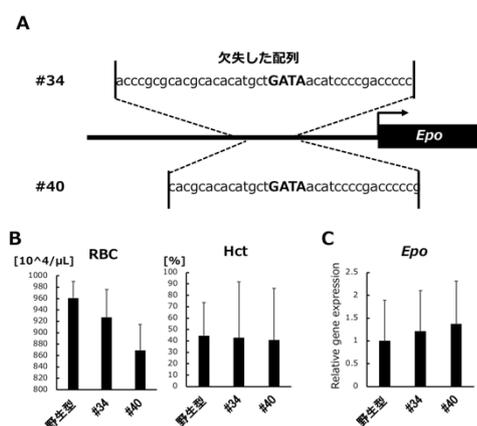
(2) MTX や化合物 A による *Epo* 遺伝子転写誘導効果がマウス由来細胞株に限定されたものであることも考えられたため、ヒト細胞における *EPO* 遺伝子発現誘導能を検証するために、本来 EPO 産生を行わないヒト肺胞上皮細胞由来細胞株である A549 細胞株やヒト総胆管癌由来細胞株 TFK-1 などの細胞株に対する投与実験を行った。その結果、MTX や化合物 A は、これらの細胞株における *EPO* 遺伝子の発現を誘導することが示された。また、細胞株を用いた *in vitro* の系だけでなく、個体レベルでも MTX および化合物 A による *Epo* 遺伝子転写誘導能があることを示すため、マウス個体に対する MTX および化合物 A の投与実験を行った。その結果、これらの化合物を投与したマウス個体の肺において、化合物投与により *Epo* 遺伝子の転写が亢進することを示した。これらの結果は、MTX や化合物 A およびそれらの合成展開により得られるであろう化合物がヒト個体に対しても *EPO* 遺伝子誘導能を示す可能性が高いことを示唆している。しかし、MTX や化合物 A が *EPO/Epo* 遺伝子の発現を誘導する効果が認められた一方で、上皮系細胞由来細胞株の培養系を用いた ELISA 法などによる EPO タンパク質の発現解析を実施した結果では、EPO タンパク質発現は確認できなかった。これらの上皮系細胞における *EPO/Epo* 遺伝子の発現量は元々非常に低いことが、EPO タンパク質の誘導効果を確認できなかった原因となっていることが予想された。また、マウス個体への投与実験の結果においても、MTX や化合物 A による血漿中 EPO 濃度の有意な上昇効果は認められなかった。MTX や化合物 A は抗がん剤として知られている物質でもあり、EPO 誘導能以外の作用が原因となり EPO 産生亢進効果および造血促進効果が見られなかったものと考えられた。そのため、当初予定していた *dCURE-GFP* マウスへの投与実験による解析では、これらの薬剤の作用機序の解明には至らないことが予想された。

(3) REP 細胞などの EPO 産生細胞において EPO 遺伝子の転写は転写因子 HIF により正に制御されるが、その一方で一部の EPO 非産生細胞では転写因子 GATA により抑制的に制御されていることが報告されている。これらの EPO 非産生細胞では、*Epo* 遺伝子プロモーター領域へ GATA 因子が結合することにより、異所性 *Epo* 遺伝子の転写を恒常的に抑制している (参考文献 1)。MTX は GATA の阻害剤としての機能も報告されていることから (参考文献 2, 3)、MTX や化合物 A は、*Epo* 遺伝子プロモーター領域への GATA 因子の結合を阻害することにより *Epo* 遺伝子発現を誘導していると考えられた。そこで、MTX や化合物 A による *Epo* 遺伝子発現誘導の機序を明らかにすることを目標に、*Epo* 遺伝子プロモーター領域内の GATA 結合配列を破壊した遺伝子改変マウスを樹立し、同領域への

GATA 結合による EPO 産生の抑制効果の検証を試みた。CRISPR/Cas9 システムを用い、*Epo* 遺伝子プロモーター領域の GATA 配列近傍の PAM 配列を標的にしたガイド RNA を利用し遺伝子改変マウスを樹立したところ、GATA 配列を含む領域を欠失したマウス系統を 2 系統得た (図 A)。これらの系統の血液学的な解析をおこなった結果、どちらの系統も定常状態において正常な血算値を示した (図 B)。また、同腹仔個体をコントロールにし肺や腎、肝における *Epo* 遺伝子発現量を qRT-PCR 法により解析した結果においても *Epo* 遺伝子発現に有意な差は認められなかった (図 C)。これらの結果は、定常状態においては GATA 阻害による *Epo* 遺伝子の転写誘導効果は限定的である可能性を示唆する。また、GATA による *Epo* 遺伝子の転写制御は抑制性の制御であることから、低酸素ストレスなどの刺激下または既に誘導された *Epo* 遺伝子の抑制時に GATA 阻害剤は効果を示すと考えている。今後、MTX や化合物 A については *EPO* 遺伝子誘導能のみを持つ化合物を合成展開により探索する。また得られている MTX、化合物 A 以外の候補化合物についても *dCURE-GFP* マウスや今回樹立したマウスなどへの投与実験により、*Epo* 遺伝子転写誘導能の検証およびその作用機序の解明を進める予定である。

参考文献

1. Obara N, Suzuki N, Kim K, et al., *Blood*. 2008 May 15;111(10):5223-32.
2. Yu L, Moriguchi T, Kaneko H, et al., *Mol Cell Biol*. 2017 Oct 27;37(22):e00211-17.
3. Kaneko H, Katoh T, Hirano I, et al., *Genes Cells*. 2017 Nov;22(11):939-952.



(図)
A: 樹立した *Epo* 遺伝子プロモーター領域内 GATA 結合配列を除去したマウス系統の除去配列
B: 各系統の末梢血赤血球数とヘマトクリット値
C: 各系統の肺における *Epo* 遺伝子の発現量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤剛英、金子寛、平野育生、長谷川敦史、可野邦行、大澤宏祐、青木淳賢、土井隆行、山本雅之、清水律子
2. 発表標題 腎性貧血の新規治療薬となる化合物の創出
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第83回例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平野育生、長谷川敦史、金子寛、加藤剛英、山本雅之、清水律子
2. 発表標題 低酸素非依存性のエリスロポエチン産生を異所的に誘導する化合物の探索
3. 学会等名 第7回低酸素研究会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考