

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16170

研究課題名（和文）慢性腎臓病の分子病態解明に向けた腎エリスロポエチン産生細胞由来細胞株の解析

研究課題名（英文）Analysis of the cell line derived from renal erythropoietin producing cell for elucidating the molecular pathophysiology of chronic kidney disease

研究代表者

佐藤 浩司（Sato, Koji）

順天堂大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60888650

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：腎エリスロポエチン（EPO）産生細胞（REP細胞）由来の細胞株であるReplic細胞は、TGFシグナルの活性化および低酸素誘導因子HIF2の遺伝子領域のDNAメチル化により、EPO産生能を喪失し、筋線維芽細胞の性質を有している。同細胞株において、TGF阻害やHIFの再活性化を試みたが、形質の部分的な可塑性は認められた一方でEPO産生能の回復は認めず、Replic細胞は形質転換の進行した筋線維芽細胞のモデルと考えられた。追加解析では、CD73は形質転換の進行に伴い発現が減弱し、Calponin 1は逆の傾向を示したことから、これらは腎線維化の有用なマーカーである可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

REP細胞は、腎間質に存在する線維芽細胞であり、健常時は低酸素誘導的にEPOを産生するが、腎障害時には、筋線維芽細胞に形質転換することで、腎線維化において中心的役割を担う。そのため、REP細胞を直接解析することは、慢性腎臓病の主病態である腎線維化の病態解明に有用と考えられるが、REP細胞は単離・培養が困難であることから、その解析は進んでいなかった。筆者らあは先行研究でREP細胞由来の細胞株を樹立したため、その解析を通じて、腎線維化の重症度評価に有用な可能性のあるマーカーを明らかにした。本研究結果は、腎線維化の病態解明と新規治療ターゲットの同定の一助になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Replic cells, a cell line derived from renal erythropoietin (EPO) producing cells (REP cells), have lost their EPO production ability and have myofibroblast characteristics due to activation of TGF signaling and DNA methylation of the gene region for the hypoxia-inducible factor 2. Inhibition of TGF and reactivation of HIF in Replic cells resulted in partial plasticity of the myofibroblast characteristics but no recovery of EPO production ability, suggesting that Replic cells are a model for myofibroblasts that have advanced transformation. Additional analysis showed that CD73 was downregulated as transformation progressed, and Calponin 1 showed an opposite trend, suggesting that these may be useful markers of renal fibrosis.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病 腎線維化 腎性貧血 エリスロポエチン 低酸素誘導因子 DNAメチル化 TGF

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 腎線維化は慢性腎臓病 (Chronic kidney disease: CKD) の主病態である。また、CKD の重要な合併症である腎性貧血は、腎臓からの造血刺激因子エリスロポエチン (Erythropoietin: EPO) の産生低下によって発症する。EPO は腎尿管間質に存在する線維芽細胞である腎 EPO 産生細胞 (Renal EPO producing cells: REP 細胞) により産生されるが、REP 細胞は、健常時は低酸素誘導因子 Hypoxia inducible factor 2 $\alpha$  による制御により、低酸素誘導的に EPO を産生する一方、腎障害時には形質転換することで EPO 産生能を喪失し、腎線維化において中心的役割を担う筋線維芽細胞に形質転換する。すなわち、REP 細胞は CKD における腎線維化と腎性貧血の双方において中心的な役割を担う細胞である。

(2) CKD の病態解明には REP 細胞の直接解析が望ましいが、REP 細胞は生体からの単離や培養が困難であることから、その解析は進んでいなかった。筆者らは先行研究で、REP 細胞特異的に蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変マウスを用いて REP 細胞由来の細胞株 (REP cell lineage immortalized cells: Replic 細胞) を樹立した<sup>[1]</sup>。同細胞株は、細胞自律的な TGF $\beta$  シグナルの活性化により、筋線維芽細胞の性質を維持しており、HIF2 $\alpha$  と EPO の遺伝子領域の DNA メチル化により、EPO 産生能を喪失していた。このことから、Replic 細胞は、CKD において形質転換し、腎線維化と腎性貧血の発症において中心的役割を担う筋線維芽細胞 (Myofibroblast-transformed REP cells: MF-REP cells) の性質を有していると考えられた。また、これまでの研究から、REP 細胞の形質転換は段階的であり、EPO 産生能や形質転換の可塑性は、その程度の影響を受ける可能性が指摘されている<sup>[2]</sup>。以上のことから、Replic 細胞のさらなる解析は、CKD における腎線維化と腎性貧血の病態解明と新規治療ターゲットの同定に有用と考えられる。

## 2. 研究の目的

### (1) Replic 細胞における EPO 産生誘導の可塑性について

Replic 細胞は、EPO と HIF2 $\alpha$  の遺伝子領域の DNA メチル化により、EPO 産生能を喪失していた。また、同細胞株の遺伝子発現解析では、DNA メチル化酵素 (DNA methyltransferase: DNMT) の中でも、細胞分裂の際に DNA メチル化パターンを維持する DNMT1 の発現が比較的高かったため、申請者らは、DNMT1 阻害薬である 5-Aza-2-deoxycytidine (5-Aza) の投与を行ったが、遺伝子のエンハンサー領域のメチル化は除去された一方で、プロモーター領域のメチル化は除去されなかった。このことから、プロモーター領域では de novo メチル化酵素である DNMT3 が作用している可能性が考えられた。また DNMT は TGF $\beta$  により発現が誘導されるため、Replic 細胞で更新している細胞自律的な TGF $\beta$  シグナルの影響も否定はできなかった。本研究では、薬剤や遺伝子導入を介して、Replic 細胞において DNMT や TGF $\beta$  の阻害や HIF の活性化を誘導し、Replic 細胞における EPO 産生能の可塑性を評価する。

### (2) Replic 細胞を用いた腎線維化マーカーの評価

Replic 細胞は細胞自律的な TGF $\beta$  発現により、筋線維芽細胞の性質を有している。Replic 細胞において EPO 産生能の可塑性が認められなかった場合は、同細胞株は形質転換の進行した REP 細胞とみなすことができるため、同細胞株における線維化マーカーやサイトカインの発現の評価は、腎線維化の重症度を評価できるマーカーの同定につながることを期待される。そのため、種々の線維化マーカーの同細胞株での発現を評価し、腎臓由来の線維芽細胞と比較検討することにより、腎線維化の重症度を評価するのに有用なマーカーの検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) Replic 細胞における EPO 産生誘導の評価・DNA メチル化状況の評価

Replic 細胞への遺伝子導入による HIF2 $\alpha$  過剰発現：先行研究では、プラスミドベクターによる HIF2 $\alpha$  過剰発現では Replic 細胞への低酸素誘導に不十分であったため、ウイルスベクターを用いた HIF2 $\alpha$  恒常的過剰発現を行う。また、Replic 細胞では、DNA メチル化酵素のうち、DNMT1 に次いで DNMT3b の発現が高かったこと、DNMT は TGF $\beta$  によって誘導されることから、DNMT1 阻害薬である 5-Aza-2'-deoxycytidine に加え、DNMT3 阻害薬である RG108、TGF $\beta$  阻害薬である SB431542 の同時投与を行う。上記の介入により、Replic 細胞における DNA メチル化状況の評価と、EPO 産生誘導の評価を行う。Replic 細胞の由来マウスでは、Epo 遺伝子は GFP との融合遺伝子であるため、同細胞株における Epo 産生誘導は、EpoGFP の遺伝子発現、または GFP による蛍光標識で評価することができる。また、DNA メチル化の評価は、Bisulfite sequencing で行う。

### (2) EPO 産生制御機構の解明・腎線維化バイオマーカーの開発

Replic 細胞で EPO 産生誘導が確認された場合は、同細胞株を用いて EPO 産生制御の詳細を明らかにする。先行研究では、EPO 遺伝子発現制御に重要な領域は転写開始点から 17.4 ~ 3.6kb

上流と推定されているため、クロマチン免疫沈降シーケンスやゲノム編集を駆使し、より詳細な解析を行う。また、Replic 細胞で EPO 産生が誘導された場合、同細胞株は、腎が高度に線維化しても EPO 産生が潜在的に可能であることを示す貴重なツールとして様々な研究に応用できる。Replic 細胞で EPO 産生誘導が確認されなかった場合は、同細胞株は不可逆的に形質転換した REP 細胞のモデルとみなすことができる。マウス腎から単離した種々の形質転換段階の筋線維芽細胞と比較解析することにより、REP 細胞の形質転換度、すなわち腎線維化の進行度を評価できる新規マーカーの探索を行う。線維化マーカーの解析には、既知の線維化マーカーを用いたリアルタイム PCR、Western Blotting のほか、RNA シーケンスによる網羅的な評価を行うことも検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) Replic 細胞における EPO 産生誘導の評価・DNA メチル化状況の評価

Replic 細胞における EPO 産生能の可塑性を評価するために、ウイルスベクターを用いた HIF2 $\alpha$  の恒常的過剰発現を同細胞に対して様々な条件下で試みた。しかしながら、遺伝子導入は確認されず、現時点では HIF2 $\alpha$  の恒常的過剰発現の実験系は確立できていない。また、Replic 細胞の EPO 産生能喪失の原因として DNMT の発現亢進が考えられており、Replic 細胞では、DNMT のなかでも DNMT1 および DNMT3b の発現が特に亢進していた。先行研究で 5-Aza を Replic 細胞に投与した結果、EPO と HIF2 $\alpha$  の遺伝子領域の一部で有意な DNA メチル化の減少が確認されたことから、5-Aza に加え、DNMT3b を阻害する RG108、および、DNA メチル化や線維化マーカー高発現の一因として考えられる TGF $\beta$  シグナルを阻害する SB431542 を同時 Replic 細胞に投与したところ、 $\alpha$ SMA などの線維化マーカーの遺伝子発現は有意に低下したが、HIF 安定化薬の投与による低酸素刺激を加えても EPO 産生誘導は同時点では認められなかった。そこで、Replic 細胞ではエピジェネティックな機序による EPO と HIF2 $\alpha$  の遺伝子発現抑制が EPO 産生能喪失に寄与している可能性が考えられたため、DNA メチル化以外のエピジェネティックな遺伝子発現制御機構である、ヒストンのアセチル化に着目した。ヒストンアセチル化はクロマチンの構造変化により遺伝子発現を変化させ、遺伝子発現に促進的に働きうるため、ヒストン脱アセチル化酵素 (Histone Deacetylase: HDAC) 阻害剤を Replic 細胞に投与した。遺伝子発現では、低酸素刺激下での EPO 遺伝子発現や、REP 細胞のマーカーのひとつである PDGFR $\beta$  の誘導は認められなかったが、HIF2 $\alpha$  の遺伝子発現が 20 倍程度誘導されていた。通常 HIF の活性は、遺伝子レベルではなくタンパク質レベルで発現が制御されているため、HIF2 $\alpha$  遺伝子発現亢進の機序や意義については、さらなる検討を要するが、過去の解析では Replic 細胞の HIF2 $\alpha$  発現は由来とする遺伝子改変マウスの 100 ~ 1000 分の 1 程度であったため、形質転換的部分的な可塑性を示す所見の可能性はある。一方、REP 細胞のマーカーである CD73 の遺伝子発現はむしろ低下しており、HDAC 阻害剤により様々な遺伝子発現が異なる調節を受け、細胞の性質が変化している可能性が考えられた。さらに申請者は、Replic 細胞の細胞株としての特性に着目し、追加解析を行った。Replic 細胞の不活化には変異型ヒト HRAS 遺伝子導入を用いているが、RAS シグナルは DNA メチル化を誘導することが知られており、Replic 細胞における DNA メチル化亢進の誘因として検討すべきと考えられた。そのため、RAS シグナル阻害剤である Farnesyl Thiosalicylic Acid (FTS) を Replic 細胞に投与し、その遺伝子発現の変化について検討した。結果、PDGFR $\beta$  や HIF2 $\alpha$  の発現誘導や、EPO 産生誘導は認められず、EPO 産生に関わる遺伝子発現に明らかな変化を認めなかった。線維化マーカーについては有意差を認めなかったものの、若干の低下傾向を認めた。

以上から、ウイルスベクターによる遺伝子過剰発現、TGF $\beta$  や RAS シグナルの阻害、エピジェネティックな機序への介入などの結果、部分的な形質転換の可塑性は認められたものの、現時点で EPO 産生能は認められず、Replic 細胞は高度に形質転換した REP 細胞のモデルと考えられた。そのため、Replic 細胞において既知の REP 細胞のマーカーや、各種線維化マーカーの評価を行った。まず、REP 細胞のマーカーである CD73 について、セルソーティングで CD73 発現が高い群と低い群に分取したところ、発現が高い群で線維化マーカーの発現が低いことが明らかになったため、CD73 は線維化の重症度、すなわち REP 細胞の形質転換の度合いと逆相関を示すことが示された。さらに臓器線維化のマーカーとして、Replic 細胞の既報で解析されている  $\alpha$ SMA、Fibronectin 1 のほか、細胞骨格に結合し平滑筋細胞などの収縮を促すタンパク質である Calponin 1 や、細胞外基質を構成する糖タンパク質である Tenascin C などの分子を含めて評価を行った。結果、いずれのマーカーも、コントロールとして用いたマウス胚線維芽細胞 (Mouse embryonic fibroblast: MEF) と比較して、Replic 細胞において高発現していた。さらに、TGF $\beta$  阻害剤である SB431542 の投与や、Replic 細胞の形質を弱めることが明らかとなっている Mesenchymal stem cell growth medium (MSCM) への培地交換により、 $\alpha$ SMA と同様、Calponin 1 および Tenascin C の発現も低下した。さらに、Calponin 1 の遺伝子発現は MSCM への培地交換直後から著明に抑制されており、その変動は鋭敏だった。Calponin 1 および Tenascin C の発現は TGF $\beta$  によって誘導されることが報告されているが、この結果からは Calponin 1 は TGF $\beta$  シグナルの下流で特異的に制御される可能性が考えられた。 $\alpha$ SMA、Calponin 1 とともに比較的後期の筋線維芽細胞のマーカーだが、本結果から、 $\alpha$ SMA は TGF $\beta$  シグナル以外の様々

なストレスにより誘導される一方、Calponin 1 は TGF $\beta$  により制御される筋線維芽細胞マーカーとしてより有用である可能性が示唆された。

以上の研究結果から、REP 細胞由来の細胞株である Replic 細胞は、段階的な形質転換が高度に進行しており、腎線維化の病態解明に有用な細胞株であることが明らかとなった。また、その解析を通じて、REP 細胞のマーカーである CD73 が、筋線維芽細胞への形質転換度の評価においても有用であることが示され、Calponin 1 が、TGF $\beta$ シグナルを中心とする線維化病態の重症度を評価できる有用なマーカーであることが示唆された。Replic 細胞の解析は、CKD における腎線維化の病態を明らかにするうえで有用である。

#### 引用文献

- [1] Sato K, Hirano I, Sekine H, Miyauchi K, Nakai T, Kato K, Ito S, Yamamoto M, Suzuki N. An immortalized cell line derived from renal erythropoietin-producing (REP) cells demonstrates their potential to transform into myofibroblasts. *Sci Rep.* 2019;9:11254;10.1038/s41598-019-47766-5
- [2] Sato K, Kumagai N, Suzuki N: Alteration of the DNA Methylation Signature of Renal Erythropoietin-Producing Cells Governs the Sensitivity to Drugs Targeting the Hypoxia-Response Pathway in Kidney Disease Progression. *Front Genet* 2019;10:1134;10.3389/fgene.2019.01134

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------