

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790792

研究課題名（和文） 不死化技術を用いたエリスロポエチン産生細胞の検討

研究課題名（英文） Development of EPO-producing cell using immortalize system

研究代表者

人見 浩史（HITOMI HIROFUMI）

香川大学・医学部・助教

研究者番号：70346641

研究成果の概要（和文）：

エリスロポエチン産生細胞の不死化を目的とし、はじめに種々の細胞の不死化を行った。エリスロポエチン産生細胞を安価で高効率に検出する方法として、エリスロポエチンレポーターラインを作製し、GFPを発現させることでセルソーターによるエリスロポエチン産生細胞の検出と選別を容易にした。エリスロポエチンを強制発現させるベクターを作製し、長期間にわたり大量のエリスロポエチンを産生することを確認した。

研究成果の概要（英文）：

We developed immortalized cells derived from several cell lines to establish immortalized erythropoietin-producing cells. Erythropoietin production was easily detected using the reporter line system. Erythropoietin-producing cells which expressed GFP were selected by cell sorter. In addition, we developed an erythropoietin-overexpress vector, and confirmed the long-term production of erythropoietin in vector-transfected cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：腎臓内科学、再生医学、薬理学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、腎臓内科学

キーワード：移植・再生医療、遺伝子、エリスロポエチン、腎性貧血、不死化細胞

## 1. 研究開始当初の背景

腎臓代替療法として血液透析および腹膜透析は確立された医療であり、我が国においては、およそ30万人がこれにより腎臓機能を代替されている。しかしながら、これらの治療は腎臓の機能を全て補完することは出来ない。その代表的な病態として、エリスロポエチンの欠乏に伴う腎性貧血がある。近年、腎性貧血に対しては、遺伝子組み換え技術で

合成されたエリスロポエチン製剤が広く用いられている。これにより輸血療法を主体とする従来の治療と比較し、腎性貧血のコントロールは容易になり、ウイルス感染や鉄過剰の問題が改善された。しかし間歇的なエリスロポエチン投与は非生理的とも考えられる。また、必要量のエリスロポエチンが投与されていない症例も少なくない。腎性貧血は心血管イベントの発症と密接に関連しているこ

とが知られ、十分なエリスロポエチン投与により、これらが抑制される可能性が示唆されている。一方で、エリスロポエチンの過剰投与により、脳や心血管疾患のリスクがむしろ増大することも報告されており、エリスロポエチンの適正投与量については未だ議論が多い。そのためエリスロポエチンの投与において、より生理的な調節が必要とされているが、現在の治療では満たされていない。また慢性腎不全患者数は増加の一途を辿っている。腎臓代替療法を必要とする患者数の増加に伴い、エリスロポエチン製剤を投与される患者数も増加している。遺伝子組み換えエリスロポエチン製剤の需要は、世界的にも増加しており、薬剤販売額の統計においても常に上位に位置している。そのため我が国のみならず、多くの国の医療経済に対する負担は大きく、安価なエリスロポエチン補充を含む腎性貧血の治療が渴望されている。

エリスロポエチンは腎臓と肝臓で産生され、骨髄における赤血球系の産生に関与していることが知られていたが、発現調節機構と産生する細胞について、明らかとなっていなかった。近年、エリスロポエチン産生細胞が腎臓で同定され、その発現機序も徐々に解明されてきた。申請者はこの点に着目し、エリスロポエチン産生細胞を生体材料として用いることで、より生理的で安価な腎性貧血治療の可能性を模索してきた。これまで申請者は細胞培養技術の臨床応用を目的として研究を行っており、その一つとして細胞の不死化に興味を持ち予備的な実験を重ねてきた。細胞はテロメアにより一定の回数 of 細胞分裂を行うと、増殖を停止するという一種の細胞寿命を有している。そのため生体から細胞を採取し、それを増殖し生体に移植し、生体適合性の高い代替臓器としての臨床応用を考える場合、増殖が十分に行われない制限がある。そこでテロメアの制御に関与しているSV40T やテロメア逆転写酵素を導入することにより、永続的な細胞増殖、いわゆる細胞の不死化という技術が開発されてきた。しかしながらエリスロポエチン産生細胞を不死化し、生体材料として用いる試みはなされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究課題は不死化細胞の技術を利用し、エリスロポエチン産生細胞をクローン化し、大量に培養した後に、生体に自家移植し、生理的な腎性貧血の改善を可能にすることを目的とする。そのため実験は、不死化細胞技術を確立した後、エリスロポエチン産生細胞を同定し、不死化遺伝子を導入する。また実験動物にエリスロポエチン産生細胞を導入するために、モジュールの開発を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) エリスロポエチン産生細胞の検出

エリスロポエチンの産生を、PCR と Western blot 法を用いて確認する。安価にエリスロポエチンの産生を検出する目的で、エリスロポエチンレポーターラインを作製し、GFP を発現させることでセルソーターによるエリスロポエチン産生細胞の検出を行う。

### (2) 不死化遺伝子の導入

エリスロポエチン産生細胞を不死化する。癌遺伝子であるSV40Tをコードするレトロウイルスベクター (SSR#69) を、産生細胞に感染させることで不死化を行う。このレトロウイルスベクターはハイグロマイシン耐性遺伝子もコードしているため、不死化された細胞のみをハイグロマイシンによって選択することが出来る。細胞の不死化が困難な場合は、テロメア逆転写酵素をコードするレトロウイルスベクター (SSR#197) を感染させる。このベクターは GFP もコードしているため、感染された細胞をセルソーターにて選択する。

### (3) エリスロポエチン遺伝子導入

エリスロポエチンの産生が困難な場合、細胞にエリスロポエチン遺伝子を導入する。導入する細胞として、内分泌能があり生検と培養が容易な線維芽細胞を用いる。

## 4. 研究成果

### (1) エリスロポエチン産生細胞の検出

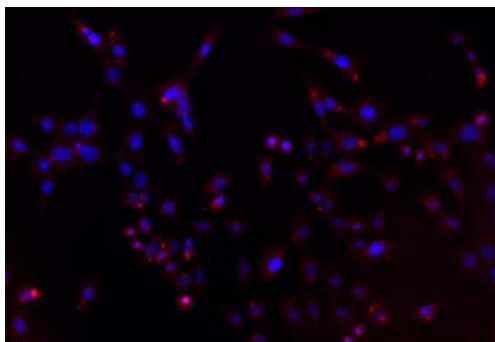
エリスロポエチン産生細胞の検出に関して、簡便に産生細胞をスクリーニングすることを目的に、RT-PCR 法や ELISA を用いたシステムを構築した。このシステムを用いることにより、実験動物から採取したサンプルや、培養細胞より得られたサンプルから、エリスロポエチンを産生する細胞を同定することが可能となった。腎臓由来の組織や細胞でエリスロポエチンの産生を mRNA や蛋白レベルで確認した。低酸素刺激にて蛋白発現が増強することを明らかにした。またエリスロポエチン産生細胞を安価で高効率に検出する方法として、エリスロポエチンレポーターラインを作製し、GFP を発現させることでセルソーターによるエリスロポエチン産生細胞の検出と選別を容易にした。

### (2) 不死化遺伝子の導入

種々の細胞の不死化を行い、エリスロポエチン産生細胞の不死化に応用可能かを検討した。血管平滑筋細胞やヒト腎臓由来細胞の不死化を行い、GFP 発現ベクターを導入した。RT-PCR 法や蛍光顕微鏡を用いた検討により、細胞に不死化遺伝子が導入されたことを確認した。また長期間の培養によって細胞の表現系が変化しないことも確認している。セルソーターを用いることにより、従来の方法に比較し、高速かつ効率的にダメージの少ない

細胞を回収し、大量培養に必要な技術を確認した。

(3) エリスロポエチン遺伝子導入  
エリスロポエチンの強制発現ベクターを作製した。長期間にわたり大量のエリスロポエチンが産生されることを確認した。



(図) エリスロポエチン強制発現ベクターを導入した細胞  
免疫蛍光染色で赤く染色されるエリスロポエチンの産生が確認される。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 30 件)

- ① [Hitomi H](#) (他 13 名、9 番目) Renal sympathetic denervation suppresses de novo podocyte injury and albuminuria in rats with aortic regurgitation. *Circulation*. 2012;125:1402-13. 査読あり
- ② [Hitomi H](#) (他 9 名、10 番目) Aldosterone Induces Vascular Insulin Resistance by Increasing Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor and Hybrid Receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:257-63. 査読あり
- ③ [Hitomi H](#) (他 9 名、4 番目) Aldosterone Does Not Contribute to Renal p21 Expression During the Development of Angiotensin II-Induced Hypertension in Mice. *Am J. Hypertens*. 2012;25:354-8. 査読あり
- ④ [Hitomi H](#) (他 17 名、11 番目) Early treatment with olmesartan prevents juxtamedullary glomerular podocyte injury and the onset of microalbuminuria in type 2 diabetic rats. *Am J. Hypertens*. 2012;25:604-11. 査読あり
- ⑤ [Hitomi H](#) (他 10 名、1 番目) Angiotensin II shifts insulin signaling into vascular remodeling from glucose metabolism in vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens* 2011;24:1149-55. 査読あり
- ⑥ [Hitomi H](#) (他 11 名、2 番目) Prorenin induces vascular smooth muscle cell proliferation and hypertrophy via EGF receptor-mediated ERK and Akt activation pathway. *J Hypertension* 2011;29:696-705. 査読あり
- ⑦ [Hitomi H](#) (他 10 名、2 番目) Mechanical stretch augments insulin-induced vascular smooth muscle cell proliferation by insulin-like growth factor-1 receptor. *Exp Cell Res* 2011;317:2420-8. 査読あり
- ⑧ [Hitomi H](#) (他 13 名、8 番目) Relationship between urinary angiotensinogen and salt sensitivity of blood pressure in patients with IgA nephropathy. *Hypertension* 2011;58:205-11. 査読あり
- ⑨ [Hitomi H](#) (他 10 名、2 番目) Effect of Efonidipine on TGF- $\beta$ 1-Induced Cardiac Fibrosis Through Smad2-Dependent Pathway in Rat Cardiac Fibroblasts. *J. Pharmacol. Sci.* 2011;117:98-105. 査読あり
- ⑩ [Hitomi H](#) (他 10 名、3 番目) Effects of mineralocorticoid receptor blockade on glucocorticoid-induced renal injury in adrenalectomized rats. *J Hypertension* 2011;29:290-8. 査読あり
- ⑪ [Hitomi H](#) (他 9 名、3 番目) Angiotensin II induces human astrocyte senescence via reactive oxygen species production. *Hypertens Res* 2011;34:479-83. 査読あり
- ⑫ [Hitomi H](#) (他 13 名、5 番目) Blockade of angiotensin II AT1 receptors protects the blood brain barrier and cognition in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2011;24:362-8. 査読あり
- ⑬ [Hitomi H](#) (他 13 名、3 番目) Aldosterone /Mineralocorticoid receptor stimulation induces cellular senescence in the kidney. *Endocrinology* 2011;152:680-8. 査読あり
- ⑭ [Hitomi H](#) (他 12 名、9 番目) Urinary angiotensinogen reflects the activity of intrarenal renin-angiotensin system in patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:170-7. 査読あり
- ⑮ [Hitomi H](#) (他 10 名、10 番目) Blood glucose level and survival in streptozotocin-treated human chymase transgenic mice. *Chinese J Physiol* 2011;54:30-5. 査読あり
- ⑯ [Hitomi H](#) (他 3 名、2 番目) Pathophysiological roles of aldosterone and mineralocorticoid receptor in the kidney. *J Pharmacol Sci* 2011;115:1-7. 査読あり
- ⑰ [Hitomi H](#) (他 4 名、2 番目) Possible involvement of the (pro)renin receptor-dependent system in the development of insulin resistance. *Front Biosci* 2011;3:1478-85. 査読あり
- ⑱ [Hitomi H](#) (他 8 名、6 番目) Roles of central renin-angiotensin system and afferent renal nerve in the control of systemic hemodynamics in rats. *Hypertens Res* 2011;34:1228-32. 査読あり
- ⑲ [Hitomi H](#) (他 6 名、1 番目) Vascular smooth muscle insulin resistance, but not hypertrophic signaling, is independent of Angiotensin II-induced IRS-1 phosphorylation by JNK. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;301:C1415-22. 査読あり

⑳ Hitomi H (他 7 名、4 番目) Short-term calorie restriction in early life attenuates the development of proteinuria but not glucose intolerance in type 2 diabetic OLETF rats. ISRN Endocrinology 2011;2011:768637. 査読あり  
□ Hitomi H (他 11 名、3 番目) Involvement of mineralocorticoid receptor in high glucose-induced BMK1 activation and mesangial cell proliferation. J Hypertension 2010;28:536-42. 査読あり  
□ Hitomi H (他 2 名、1 番目) Role of (pro)renin receptor in cardiovascular cells from the aspect of signaling. Front Biosci 2010;2:1246-9. 査読あり  
□ Hitomi H (他 8 名、2 番目) Mechanical stretch potentiates angiotensin II-induced proliferation in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells. Hypertens Res 2010;33:1250-7. 査読あり  
□ Hitomi H (他 13 名、13 番目) Mineralocorticoid receptor blockade enhances the anti-proteinuric effect of an angiotensin II blocker through inhibiting podocyte injury in type 2 diabetic rats. J Pharmacol Exp Ther 2010;332:1072-80. 査読あり  
□ Hitomi H (他 9 名、6 番目) Systemic candesartan reduces brain angiotensin II via downregulation of brain renin-angiotensin system. Hypertens Res 2010;33:161-4. 査読あり  
□ Hitomi H (他 1 名、2 番目) Role of caveolin and heat shock protein 70 interaction in the antioxidative effects of an angiotensin II type 1 receptor blocker in spontaneously hypertensive rats. J Hypertension. 2010;28:9-12. 査読あり  
□ Hitomi H (他 13 名、8 番目) Cilnidipine suppresses podocyte injury and proteinuria in metabolic syndrome rats: possible involvement of N-type calcium channel in podocyte. J Hypertension 2010;28:1034-43. 査読あり  
□ Hitomi H (他 5 名、2 番目) A novel clinical biomarker for MPO-ANCA associated glomerulonephritis. Clin Exp Pharmacol Physiol 2010;37:877-8. 査読あり  
□ Hitomi H (他 3 名、4 番目) New approaches to blockade of the Renin-Angiotensin-Aldosterone system: Mineralocorticoid receptor blockers exert antihypertensive and renoprotective effects independently of the renin-angiotensin system. J Pharmacol Sci 2010;113:310-4. 査読あり  
□ Hitomi H (他 12 名、6 番目) Regression of superficial glomerular podocyte injury in type 2 diabetic rats with overt albuminuria : effect of angiotensin II blockade. J Hypertension 2010;28:2289-98. 査読あり

[学会発表] (計 15 件)

- ① 人見浩史 他 アルドステロンによる IGF-1 受容体と Hybrid 受容体を介したインスリン抵抗性の検討、第 54 回日本腎臓学会学術総会、2011.6.17、神奈川
- ② 人見浩史 他 プロレニンの epidermal growth factor receptor を介した細胞内情報伝達系の解明、第 54 回日本腎臓学会学術総会、2011.6.17、神奈川
- ③ 人見浩史 他 アルドステロンによる IGF-1 受容体とハイブリッド受容体を介したインスリン抵抗性と血管リモデリングに与える影響、第 20 回循環薬理学会、2010.11.11、北海道
- ④ 人見浩史 他 細胞内 pH と酸化ストレスを介したアンジオテンシン II によるポドサイト障害機序の解明、第 33 回日本高血圧学会総会、2010.10.17、福岡
- ⑤ 人見浩史 他 アルドステロンによる IGF-1 受容体とハイブリッド受容体を介したインスリンによる動脈硬化に与える影響、第 33 回日本高血圧学会総会、2010.10.17、福岡
- ⑥ 人見浩史 他 Aldosterone induces insulin resistance via up-regulation of IGF-1 receptor and its hybrid receptor in vitro and in vivo、64th Annual High Blood Pressure Research Conference 2010、2010.10.14、米国
- ⑦ 人見浩史 他 アンジオテンシン II による細胞内 pH 変化と酸化ストレスを介したポドサイト障害の解明、第 53 回日本腎臓学会学術総会、2010.6.16、兵庫
- ⑧ 人見浩史 他 プロレニンの血管平滑筋細胞における受容体を介した細胞内情報伝達系の解明、第 53 回日本腎臓学会学術総会、2010.6.16、兵庫
- ⑨ 人見浩史 他 Effects of prorenin of vascular smooth muscle cell proliferation and hypertrophy via EGF receptor-mediated ERK and AKT activation pathway、12th Asian Pacific Congress of Nephrology、2010.6.5、韓国
- ⑩ 人見浩史 他 Effects of mechanical stretch on insulin-induced vascular smooth muscle cell proliferation via upregulation of insulin-like growth factor-1 receptor、12th Asian Pacific Congress of Nephrology、2010.6.5、韓国
- ⑪ 人見浩史 他 Effects of mechanical stretch on angiotensin II-induced cell proliferation in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells、12th Asian Pacific Congress of Nephrology、2010.6.5、韓国
- ⑫ 人見浩史 他 High sodium augments angiotensin II-induced proliferation of rat vascular smooth muscle cell through ERK1/2-dependent pathway、ISN Nexus、2010.4.15、京都
- ⑬ 人見浩史 他 Prorenin induces vascular smooth muscle cell proliferation and hypertrophy

via EGF receptor-mediated ERK and Akt activation pathway, ISN Nexus, 2010.4.15、京都

⑭ 人見浩史他 Mechanical stretch augments insulin-induced vascular smooth muscle cell proliferation by upregulation of insulin-like growth factor-1 receptor, ISN Nexus, 2010.4.15、京都

⑮ 人見浩史他 Mechanical stretch potentiates angiotensin II-induced proliferation in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells, ISN Nexus, 2010.4.15、京都

〔図書〕(計1件)

① 人見浩史他 南江堂、腎疾患・透析最新の治療 2011-2013、2011、26-30

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kms.ac.jp/~yakuri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

人見 浩史 (HITOMI HIROFUMI)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：70346641