

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2013～2015  
課題番号：25670157  
研究課題名(和文)慢性低酸素に対する生体恒常性維持の分子機構

研究課題名(英文)Mechanism of adaptation to chronic hypoxia

## 研究代表者

鈴木 教郎 (Suzuki, Norio)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20447254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性貧血により全身性の慢性低酸素を呈する遺伝子改変マウスの肝臓において著しく高発現する遺伝子Xを同定した。この遺伝子は、低酸素誘導性因子HIFを過剰発現するマウスや急性低酸素曝露マウスにおいても発現誘導されていたが、慢性貧血マウスにおける発現は、さらに10倍以上の高レベルであった。この遺伝子Xは酵素活性を有する分泌タンパク質をコードしており、慢性低酸素状態で何らかの役割を担っていることが示唆された。現在、この酵素を阻害する薬剤を慢性貧血マウスに投与し、その影響を解析している。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of adaptation to chronic hypoxia, we analyzed a genetically modified mouse line, in which the erythroid growth factor erythropoietin (Epo) expression was restricted in the liver. Because of loss of Epo-gene expression in the kidney, the major Epo-producing organ in adult animals, the mice developed severe anemia. Although the anemic mice exhibited systemic and chronic hypoxia, their lifespan was normal. Gene expression profiles in livers of the anemic mice were compared with those of a transgenic mouse line over-expressing HIFs (hypoxia-inducible transcription factors) the major regulator for cellular hypoxia responses. The hypoxia-inducible genes were upregulated in both lines, indicating that the HIF pathway plays a central role in adaptation to both acute and chronic hypoxia. The anemic mice showed the extremely higher induction level of gene X than the HIF transgenic mice, suggesting that the gene X product is involved in adaptation to chronic hypoxia.

研究分野：分子生物学

キーワード：低酸素応答 転写制御 貧血 代謝制御

## 1. 研究開始当初の背景

酸素は生体がエネルギーを得るために必須であり、組織への酸素供給量の低下は、生命の存続を脅かす危険な状態（低酸素ストレス）となる。低酸素ストレスは貧血による酸素供給不足や腫瘍内の血管低形成などによって発生し、病態と深く関連する（Semenza *BBA* 2011）。一方、生体は低酸素ストレスに対して、酸素の供給と消費の効率を亢進させるような低酸素環境適応システムを備えている。これまでに、低酸素応答系の分子機構解析が盛んに進められており、HIF 転写因子群を中心とした遺伝子発現制御がその基盤となっていることが知られている（Majmundar et al. *Mol Cell* 2010）。このような従来の研究は、低酸素環境に曝した動物個体や細胞を数時間から数日以内の急性反応期に解析する実験系がほとんどであった。しかし、実際の炎症、貧血、腫瘍、虚血などの病態では、低酸素状態が数ヶ月から数年持続しており、そのような慢性低酸素環境に対しても細胞は適応機構を備えていると考えられる。ところが、培養細胞や実験動物に重度の低酸素環境を長期間持続的に曝露することは難しく、慢性低酸素に対する生体応答機構の解析は進んでいない。

我々は、造血因子エリスロポエチン（Epo）の遺伝子発現制御機構を解析しており、マウスでのEpo発現部位は、胎仔期から生後2週間までの個体発生期では肝臓であり、成獣では腎臓に変遷することを示した。また、肝臓特異的なEpo遺伝子制御領域を同定した（Suzuki et al. *Mol Cell Biol* 2011）。そこで、肝臓特異的にEpoを発現するトランスジーンをEpo遺伝子欠損マウスに導入した。その結果、期待通り個体発生期のEpo産生は正常範囲であるものの、成獣に発育した段階でEpo発現が著しく減少し、赤血球数が正常マウスの3割程度の重度な貧血を呈するマウス（Epo-KDマウス）の作出に成功した（Yamazaki et al. *Nature Commun* 2013）。各種低酸素マーカー解析から、このマウスは全身性に重度の低酸素状態に陥っていることが示されたものの、寿命や繁殖能は正常であった。そこで、本マウスでは慢性低酸素適応機構が起動していると考えた。

## 2. 研究の目的

慢性低酸素適応の分子メカニズムを明らかにする目的で、慢性貧血を呈するEpo-KDマウスを慢性低酸素適応モデルとして、代謝産物と転写産物の網羅的解析を行う。得られる成果は、代謝制御と転写制御の相互作用により規定される未知のストレス応答系の発見につながるだけでなく、慢性低酸

素が関わる多くの病態の分子機構解明につながると期待される。

## 3. 研究の方法

まず、成獣で重度の慢性貧血を呈する遺伝子改変マウスEpo-KDマウスの各臓器における低酸素状態を解析した。そのために、センサーシート（Visisens）による臓器表面の酸素濃度測定および低酸素誘導性遺伝子の発現レベル解析を行った。対照サンプルとして、6%酸素濃度の飼育箱で2日間飼育した急性低酸素マウスおよび溶血性貧血を誘導した急性貧血マウスを用意した。また、Epo-KDマウスにEpo製剤を投薬し、貧血から回復した状態を1ヶ月維持した貧血回復マウスも対照マウスとして用いた。

各マウスの骨格筋、腎臓、肝臓を採取し、代謝産物の質量分析（メタボローム解析）を行った。また、同一サンプルを用いて、転写産物の網羅的解析（マイクロアレイ解析）を行った。

次に、網羅的解析の結果を検証するために、HIF2a過剰発現マウスを作出した。マイクロアレイ解析によりEpo-KDマウスに特異的な遺伝子発現様式がHIF2a過剰発現マウスで再現されているかを検討し、慢性低酸素応答機構のHIF依存性を明らかにした。

## 4. 研究成果

Epo-KDマウスは全身性に重篤な低酸素状態に陥っており、心拡張も生じていた。これらの症状は、Epo製剤を投薬した貧血回復マウスでは観察されなかったことから、貧血による低酸素状態が原因であると考えられた（図1：Suzuki et al. 論文投稿中）。

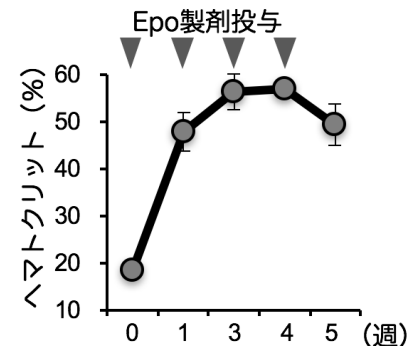


図1 Epo-KDマウスへの持続型Epo製剤（C.E.R.A.）の毎週投与による貧血からの長期間離脱状態が原因であると考えられた（図1：Suzuki et al. 論文投稿中）。

代謝産物の解析から、Epo-KDマウスの肝臓では脂肪酸およびグリコーゲンが蓄積していることが

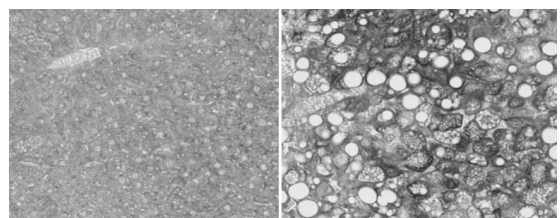


図2 正常マウス（左）およびHIF2a過剰発現マウス（右）の肝臓切片のPAS染色像。HIF2a過剰発現マウスに脂肪（空胞）およびグリコーゲン（濃い部分）の蓄積が観察される。

明らかとなった。この現象は、肝臓において HIF2a を過剰発現するマウスでも観察されたことから、HIF による転写レベルの制御機構が関わっていることが示唆された( 図 2 :Tojo et al. *Mol Cell Biol* 2015 )。

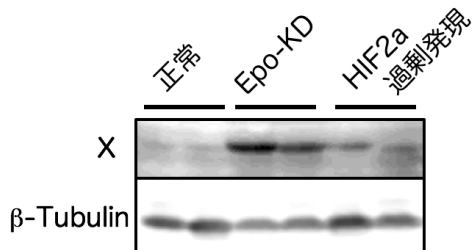


図3 Epo-KDマウス肝臓におけるXの高発現  
HIF2a過剰発現マウスの肝臓でも低レベルの誘導が観察される

しかし、脂肪酸蓄積やグリコーゲン蓄積の原因となるHIFの標的遺伝子を明らかにすることができなかったため、引き続きメカニズム解明に向けた解析を継続している。

転写産物の解析からは、Epo-KD マウスの肝臓において著しく高発現する遺伝子 X を同定した。この遺伝子は、HIF を過剰発現するマウスや急性低酸素マウス、急性貧血マウスにおいても発現誘導されていたが、Epo-KD マウスにおける発現は、さらに10倍以上の高レベルであった。この遺伝子 X は酵素活性を有する分泌タンパク質をコードしており、慢性低酸素状態で何らかの役割を担っていることが示唆された( 図 3 )。現在、この酵素を阻害する薬剤を Epo-KD マウスに投与し、その影響を解析している。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕( 計 22 件 ) 全て査読あり

1. Souma T, Nezu M, Nakano D, Yamazaki S, Hirano I, Sekine H, Dan T, Takeda K, Fong GH, Nishiyama A, Ito S, Miyata T, Yamamoto M, Suzuki N. Erythropoietin synthesis in renal myofibroblasts is restored by activation of hypoxia signaling. **J Am Soc Nephrol** 27: 428-438 (2016) doi: 10.1681/ASN.2014121184
2. Suzuki N, Yamamoto M. Roles of renal erythropoietin-producing (REP) cells in the maintenance of systemic oxygen homeostasis. **Pflugers Arch** 468: 3-12 (2016) doi: 10.1007/s00424-015-1740-2
3. Tojo Y, Sekine H, Hirano I, Pan X, Souma T, Tsujita T, Kawaguchi S, Takeda N, Takeda K, Fong GH, Dan T, Ichinose M, Miyata T, Yamamoto M, Suzuki N. Hypoxia Signaling Cascade for Erythropoietin Production in Hepatocytes. **Mol Cell Biol** 35: 2658-2672 (2015) doi: 10.1128/MCB.00161-15
4. Suzuki N, Mukai HY, Yamamoto M. In vivo regulation of erythropoiesis by chemically inducible dimerization of the erythropoietin receptor intracellular domain. **PLoS One** 10: e0119442 (2015) doi:10.1371/journal.pone.0119442
5. Sekine H, Okazaki K, Ota N, Shima H, Katoh Y, Suzuki N, Igarashi K, Ito M, Motohashi H, Yamamoto M. The Mediator Subunit MED16 Transduces NRF2-Activating Signals into Antioxidant Gene Expression. **Mol Cell Biol** 36: 407-420 (2015) doi: 10.1128/MCB.00785-15.
6. Suzuki N. Erythropoietin gene expression: developmental-stage specificity, cell-type specificity, and hypoxia inducibility. **Tohoku J Exp Med** 235: 233-240 (2015) doi: 10.1620/tjem.235.233
7. Souma T, Suzuki N, Yamamoto M. Renal erythropoietin-producing cells in health and disease. **Front Physiol** 6: 167 (2015) doi: 10.3389/fphys.2015.00167.
8. 鈴木教郎. 赤血球造血制御による個体レベルの酸素恒常性維持機構. **実験医学** 33, 1724-1730, 2015
9. 鈴木教郎. 赤血球増殖因子の産生機能の解明. **東北医学雑誌** 127: 26-28 (2015)
10. 鈴木教郎. 造血因子エリスロポエチンを産生する細胞の単離解析. **東北医学雑誌** 127: 59-60, 2015
11. 祢津昌広, 鈴木教郎, 山本雅之. EPO 産生制御機構 **腎と透析** 79: 88-93 (2015)
12. 相馬友和, 鈴木教郎 腎線維化と腎性貧血 **日腎会誌** 57: 1193-1199 (2015)
13. 山本雅之, 鈴木教郎. 酸化ストレス・低酸素ストレスと腎疾患. **Vitamembrane** 14: 1-6 (2014)
14. 関根弘樹, Lorenz Poellinger, 鈴木教郎. 低酸素応答性転写因子 HIF と疾患. **細胞工学** 33:711-715 (2014)
15. Wang L, Jia Y, Rogers H, Suzuki N, Gassmann M, Wang Q, McPherron AC, Kopp J, Yamamoto M, Noguchi CT. Erythropoietin contributes to slow oxidative muscle fiber specification via PGC-1 $\alpha$  and AMPK activation. **Int J Biochem Cell Biol** 45: 1155-1164 (2013) doi: 10.1016/j.biocel.2013.03.007
16. Yamazaki S, Souma T, Hirano I, Pan X, Minegishi N, Suzuki N, Yamamoto M. A mouse model of adult-onset anaemia due to erythropoietin deficiency. **Nature Commun** 4: 1950 (2013) doi: 10.1038/ncomms2950
17. Souma T, Yamazaki S, Moriguchi T, Suzuki N, Hirano I, Pan X, Minegishi N, Abe M, Kiyomoto H, Ito S, Yamamoto M. Plasticity of renal erythropoietin-producing cells governs fibrosis. **J Am Soc Nephrol** 24: 1599-1616 (2013) doi: 10.1681/ASN.2013010030
18. Suzuki N, Hirano I, Pan X, Minegishi N, and Yamamoto M. Erythropoietin production in neuroepithelial and neural crest cells during primitive erythropoiesis. **Nature Commun** 4: e2902 (2013) doi: 10.1038/ncomms3902
19. Miyata T, Suzuki N, van Ypersele de Strihou C. Diabetic nephropathy: are there new and potentially promising therapies targeting oxygen biology? **Kidney Int** 84: 693-702 (2013) 10.1038/ki.2013.74

20. 相馬友和、鈴木教郎、山本雅之. エリスロポエチン遺伝子の転写制御機構. **Annual Review 腎臓** **2013** 204-211 (2013)
21. 鈴木教郎. エリスロポエチンの造血外機能と産生制御機構の解明. **東北医学雑誌** 125: 98-100 (2013)
22. 鈴木教郎. 腎エリスロポエチン産生細胞: REP 細胞. **細胞** 45: 44-47 (2013)

〔学会発表〕(計 62 件)

1. 鈴木教郎「基礎生命科学におけるエリスロポエチンの功績と未来」酸素医学コアセンター特別シンポジウム, 東北大学医学部(仙台) 2015 年 7 月 10 日
2. Masahiro Nezu, Tomokazu Souma, Toshio Miyata, Masayuki Yamamoto, Norio Suzuki. Activation of Hypoxia Signaling Maintains Erythropoietin Synthesis in Renal Myofibroblasts. The 3rd Conference of the Japanese Association for Hypoxia Biology, Waseda University (Tokyo) July 25, 2015 (Young Investigators Award)
3. Norio Suzuki, Hiroki Sekine, Toshio Miyata, Masayuki Yamamoto. Hypoxia signaling cascade for in vivo erythropoietin production. Keystone symposium on Hypoxia, Dublin (Ireland) May 12-17, 2015
4. 鈴木教郎「低酸素応答と赤血球産生制御機構」東北大学循環器内科セミナー, 東北大学医学部(仙台) 2015 年 2 月 4 日
5. 鈴木教郎「エリスロポエチン産生細胞の正常と病態」第 2 回日本腎臓研究会, 経団連会館(東京) 2015 年 1 月 17 日
6. 鈴木教郎「赤血球増殖因子の産生機能の解明」東北医学会例会, 東北大学医学部(仙台), 2015 年 1 月 16 日
7. Norio Suzuki, Nikola Vojnovic, Michael Gralla, Katarina Gradin, Lorenz Poellinger. Chromatin dynamics of hypoxia regulated genes. Keystone symposium on Hypoxia, Dublin (Ireland) May 12-17, 2015
8. 鈴木教郎「腎エリスロポエチン産生細胞『REP 細胞』の筋線維芽細胞への可逆的な形質転換」第 57 回 日本腎臓学会総会, パシフィコ横浜(横浜) 2014 年 7 月 5 日
9. 鈴木教郎「造血因子エリスロポエチンの産生制御機構」第 6 回群馬分子医学研究会, 群馬大学(前橋) 2014 年 11 月 20 日
10. 鈴木教郎「Epo 欠乏性貧血モデルマウスにおける ESA の造血促進機構」第 23 回 腎とエリスロポエチン研究会, 品川プリンスホテル(東京) 2014 年 11 月 22 日
11. 加藤幸一郎, 藤田謙, 山崎瞬, 山本雅之, 鈴木教郎「エリスロポエチン遺伝子改変マウスを用いた貧血性低酸素応答機構の解析」第 2 回低酸素研究会, 早稲田大学(東京) 2014 年 7 月 26 日
12. 平野育生, 鈴木教郎「Erythropoietin 産生制御機構の解析」第 2 回低酸素研究会, 早稲田大学(東京) 2014 年 7 月 26 日

13. Norio Suzuki, Yusuke Sasaki, Yasushi Shimonaka, Masayuki Yamamoto. Continuous erythropoietic activity of epoetin beta pegol in a gene-modified mouse model for erythropoietin-deficiency anemia. The 19<sup>th</sup> Congress of European Haematology Association. Milan (Italy) June 12-15, 2014
14. Masahiro Nezu, Tomokazu Souma, Norio Suzuki, Lei Yu, Takashi Moriguchi, Sadayoshi Ito, Masayuki Yamamoto. Transcription factor Nrf2 adversely affects pregnancy-induced hypertension. The International conference on Environmental Response IV. Tohoku University, Sendai (Japan) Feb 28 - Mar 2, 2014
15. Norio Suzuki, Lorenz Poellinger. Hypoxia-responsive rearrangement of nucleosome organization in gene promoters. The International conference on Environmental Response IV. Tohoku University, Sendai (Japan) Feb 28 - Mar 2, 2014
16. Yutaka Tojo, Hironori Satoh, Toshio Miyata, Masayuki Yamamoto, Norio Suzuki. The hypoxia-response system induces immunosuppressive activity of myeloid lineage cells in tumor-bearing mice. The International conference on Environmental Response IV. Tohoku University, Sendai (Japan) Feb 28 - Mar 2, 2014
17. Norio Suzuki, Hiroki Sekine, Toshio Miyata, Masayuki Yamamoto. Hypoxia signaling cascade for erythropoietin production in hepatocytes. Keystone Symposia on Sensing and Signaling of Hypoxia. Breckenridge (Colorado, USA) Jan 7-14, 2014.
18. 鈴木教郎「酸素供給の恒常性維持における赤血球産生制御機構」第 11 回がんハイポキシア研究会シンポジウム, 東北大学(仙台), 2013 年 12 月 13 日
19. 鈴木教郎「腎エリスロポエチン産生細胞」慢性腎臓病対策講演会, ウエスティンホテル(仙台), 2013 年 11 月 21 日
20. 鈴木教郎「低酸素環境応答における腎臓の役割と遺伝子発現調節機構」第 2 回川島腎カンファレンス, エーザイ川島工園くすり博物館(各務原), 2013 年 10 月 26-27 日
21. 鈴木教郎「赤血球増殖因子エリスロポエチンの機能と産生制御機構」第 1 回 TYCOONS Seminar, 勝山館(仙台), 2013 年 8 月 3 日
22. 鈴木教郎「EPO 産生細胞の同定から機能解析へ」第 58 回日本透析医学会シンポジウム, 福岡国際会議場(福岡), 2013 年 6 月 23 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木教郎 (SUZUKI, Norio)  
 東北大学・大学院医学系研究科・講師  
 研究者番号: 20447254