

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860179

研究課題名(和文) GATA因子が切り拓く、腎性貧血の新規創薬アプローチ

研究課題名(英文) Drug discovery of next generation-erythropoiesis stimulating agent

研究代表者

金子 寛 (Kaneko, Hiroshi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80635558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：エリスロポエチン(EPO)は赤血球造血を亢進させるサイトカインであり、低酸素刺激にตอบสนองしてその発現量は増強される。しかし、近年、上皮系細胞の一部では、EPO遺伝子の発現がGATA転写因子群によって抑制されていることが示された。本研究では、遺伝学的および薬理学的手法によるGATA因子の機能抑制が、EPO発現の抑制を解除し、酸素濃度に依存せずに、異所性にEPO発現を誘導することを明らかにした。本研究成果は、EPO産生量低下に起因する腎性貧血治療の新しい創薬標的を切り開くものである。

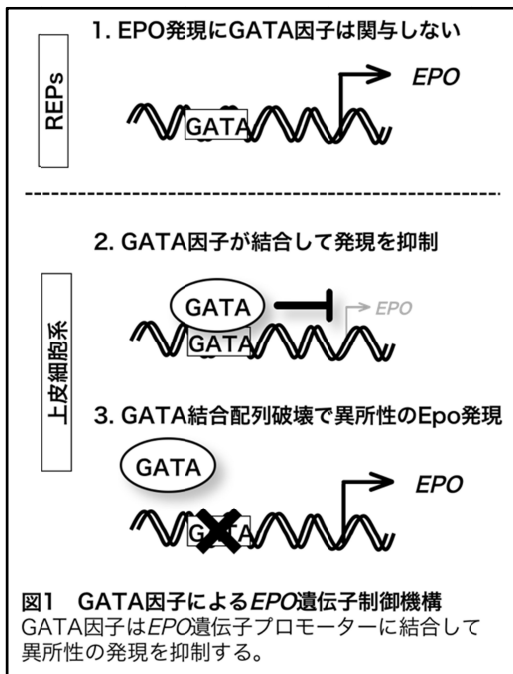
研究成果の概要(英文)：Erythropoietin (EPO) is a humoral factor potentiating erythropoiesis. EPO expression was strictly regulated by oxygen level in vivo. Recent studies revealed that Epo expression is repressed by GATA transcription factors in a part of epithelial tissues in vivo. In this study, I utilized genetic and pharmacological approach to inhibit the function of GATA factors and elucidated that disturbance of GATA factors resulted in the release of Epo expression from non-canonical EPO producing cells. These evidences clearly demonstrated the validity of GATA factors as novel therapeutic target of renal anemia.

研究分野：分子生物学、分子血液学

キーワード：GATA転写因子 エリスロポエチン 創薬

1. 研究開始当初の背景

エリスロポエチン (Epo) は赤血球造血を促進する液性因子で、成人では主に腎臓の Epo 産生細胞 (REPs) から産生される。生体内の Epo 量は、酸素環境に応じて制御されている。個体が貧血等の低酸素状態になると、低酸素応答転写因子 (HIF) がプロテアソーム系による分解から免れ、安定化する。安定化した HIF 転写因子は核内へと移行し、Epo を含む低酸素誘導性の標的遺伝子群の発現を制御する。REPs においても、低酸素刺激依存的に、Epo 産生が増強され、産生された Epo は骨髄内の赤血球前駆細胞に働きかけ赤血球分化を促すことで、赤血球による酸素運搬を改善し、生体内の酸素環境の恒常性を保つ。このような Epo の赤血球造血刺激作用から、複数のヒト EPO 遺伝子組換え製剤 (Epo 製剤) が開発されている。しかし、Epo 製剤は、遺伝子組換え製剤であるため、薬価や投与方法に問題点が指摘されており、改善が望まれている。近年は、より半減期の長い Epo 製剤の開発に加えて、Epo 受容体や HIF 転写因子の分解機構を標的とする創薬研究が行われている。そのような状況下で、申請者は、GATA 転写因子による Epo 発現抑制機構を標的とした創薬研究に取り組んできた。



GATA 転写因子群は、6 つの因子 (GATA1-GATA6) から構成されており、いずれの因子も分子中央に二つの亜鉛フィンガーをもつ。これら亜鉛フィンガーを介して DNA や共役因子と相互作用し、個体発生や組織の分化に重要な機能を果たす。近年の研究から、腎臓や肺等の上皮系細胞では、Epo 遺伝子は GATA 転写因子群による発現抑制を受

けており、そこには低酸素刺激に係る分子機構は関与しないことが示唆されていた (図 1)。しかし、実際に、上皮系細胞における GATA 因子の阻害が異所性に Epo 発現を誘導するのか、また、それら上皮系細胞由来の Epo が、REPs 由来の Epo と同様に赤血球造血能を有するかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、上皮系細胞における GATA 因子阻害が、低酸素刺激に依存せず Epo 発現を誘導すること、そして、異所性に発現した Epo が赤血球造血を促進するか、さらに、低分子化合物による異所性 Epo 発現誘導の制御が可能であるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) Epo 遺伝子プロモーター上の GATA 因子結合部位を欠失させたマウス腎集合管細胞株の作出

ゲノム編集技術を用いて、GATA 因子結合部位の欠失変異体を作成するため、GATA 因子結合部位を標的とする 2 種類の CRISPR/Cas9 ベクターを作製した。具体的には、Epo 遺伝子プロモーター内の GATA 因子結合部位の近傍 (30bp 内) の二カ所の PAM 配列を標的とする CRISPR/Cas9 構築を作製し、マウス腎集合管由来細胞株 (mIMCD) に遺伝子導入した。導入後に、G418 による薬剤選択を行い、生存した細胞集団から単一細胞クローニングを行い、株化した。GATA 因子結合部位の欠失を確認するため、各株のゲノム DNA を鋳型として、Epo 遺伝子プロモーター領域を PCR で増幅した後、TA クローニングを行い、DNA シーケンスを実施した。さらに、野生型細胞株と変異体株の Epo 発現量を解析するため、定量的 RT-PCR および抗 Epo 抗体を用いた ELISA を実施した。

(2) 上皮系細胞由来の Epo の赤血球造血促進能の解析

(1) で作出した変異体株及び野生型株を 48 時間培養し、その培養上清を回収した。回収した培養上清に、野生型マウス骨髄細胞を懸濁して 48 時間培養した。その後、ベンジン染色で陽性となる細胞数を計測した。

(3) 異所性 Epo 発現を誘導する低分子化合物のスクリーニング

GATA 因子の活性に応答するルシフェラーゼレポーター細胞株を樹立し、化合物ライブラリーのスクリーニングを実施した。得られたヒット化合物の Epo 誘導能を検討するため、腎集合管細胞株及び肺がん由来細胞株を、ヒット化合物に 12 時間または 24 時間暴露した

後 RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 解析を実施した。ヒット化合物が個体レベルで Epo 誘導能を示すか検討するため、ICR マウス(オス、8 週齢)にヒット化合物を腹腔内投与し、14 時間後または 20 時間後に、肺と腎組織を摘出し、各組織における Epo 発現量を定量的 RT-PCR で解析を実施した。

4. 研究成果

(1) GATA 因子結合部位を欠失させたマウス腎集合管細胞株の作出

得られた株の Epo 発現量を定量的 RT-PCR で解析し、野生型と比して、Epo 発現量の高い 8 株(高発現株)と、野生型と同等の Epo 発現量をもつ 3 株(低発現株)を得た。これらのうち、高発現株 4 株と低発現株 3 株の *Epo* 遺伝子プロモーター領域のシーケンスを実施したところ、4 株中 3 株で、GATA 因子結合部位の欠失変異が検出された。残り 1 株からは、CRISPR/Cas9 構築のアンピシリン耐性遺伝子のプロモーター上流領域の配列の挿入変異が認められた。よって、この変異体における Epo 発現上昇は外来性プロモーターの挿入による Epo 過剰発現、もしくは、挿入変異による Epo 遺伝子発現抑制機構の破綻が予想される。一方、低発現株では、変異無しもしくは GATA 因子結合部位を含まない欠失変異が検出された。以上のシーケンスの結果から、作出した変異株における *Epo* 遺伝子の高発現は、GATA 因子結合部位の欠失によって生じた可能性が非常に高い、と結論づけた。次に、培養上清中の Epo 量を定量するため、野生型、高発現株、そして低発現株の培養上清に含まれる Epo を ELISA 法で定量した。その結果、高発現株の培養上清中には、多量の Epo タンパク質が含まれていた。以上より、mIMCD 細胞で *Epo* 遺伝子プロモーター内の GATA 因子結合部位を欠失させることで、低酸素刺激に依存せず異所性に Epo が発現することが確認された。

(2) 上皮系細胞由来の Epo の赤血球造血促進能の解析

(1)の結果より、上皮系細胞から異所性に発現された Epo に赤血球造血の促進能があるか検討するため、マウス骨髄細胞を用いた BFU-e アッセイを行った。野生型株、高発現株、そして低発現株の培養上清を回収し、それらと骨髄細胞を懸濁したのち、メチルセルロース培地上に播種し、48 時間の培養を行った。48 時間後に、赤血球前駆細胞を染色するベンジジン染色を行い、染色されたコロニー数を計測した。高発現株の培養上清を用いたサンプルでは、野生型の培養上清にヒト遺伝子組換え Epo タンパク質を添加したサンプル

と同等数のコロニーが観察されたが、低発現株及び野生型の培養上清サンプルでは、ベンジジン陽性となる細胞はほぼ観察されなかった。ベンジジン染色は赤血球前駆細胞中のヘモグロビンを検出して発色することから、高発現株の培養上清に含まれた Epo が骨髄細胞集団に含まれる赤血球前駆細胞に作用して増殖を促進した結果、多数のベンジジン陽性コロニーが観察されたと考えられた。以上より、REPs 由来の Epo と同様に、上皮系細胞由来の Epo にも赤血球造血刺激因子としての作用があることが確認された。

(3) 異所性 Epo 発現を誘導する低分子化合物のスクリーニング

既知の GATA 阻害剤である K-7174(Umetani et al., *BBRC.*, 2000) は、炎症性サイトカインに暴露された血管内皮細胞において、*VCAM-1* 遺伝子の発現を抑制する化合物として同定され、その後の研究から、K-7174 の GATA 阻害作用が明らかとなった (Imagawa et al., *The FASEB J.*, 2003)。そこで、mIMCD 細胞や A549 細胞といった上皮系細胞を K-7174 で処理することで、異所性に Epo 発現が誘導されるか解析した。結果、両細胞株を 10 μ M K-7174 で 24 時間処理した際に、EPO 発現の変化は認められなかった。これより、K-7174 は細胞特異性をもつ GATA 阻害剤であると予想された。

そこで、上皮系細胞において Epo 誘導剤として機能しうる GATA 阻害剤を開発するため、新規の GATA 阻害剤探索を可能とするハイスループットスクリーニング系を構築した。具体的には、K-562 細胞(慢性白血病由来細胞)に β -グロビン (GATA 因子の標的遺伝子) の遺伝子発現制御下でレポーター遺伝子を発現する構築を遺伝子導入し、安定発現株を樹立した。樹立した株を用いて化合物ライブラリー (1,165 化合物) を解析し、レポーター活性を低下させた 17 化合物を (Inh% > 65%) を選別した。さらに、これら化合物の Epo 誘導能を解析するため、mIMCD 細胞及び A549 細胞に 12 時間または 24 時間暴露させたのち、Epo 発現量を定量的 RT-PCR で解析した。結果、通常酸素濃度下で、Epo 発現を有意に上昇させる化合物群を同定した。興味深いことに、これらヒット化合物を、低酸素依存的に Epo を産生する Hep3B 細胞に暴露した際には、Epo 発現の上昇は認められなかった。

次に、上皮系細胞における異所性発現誘導と低酸素応答経路の関連を解析するため、mIMCD 細胞や A549 細胞を 1%O₂ の低酸素環境下で培養し、Epo 発現量を解析した。結果、低酸素刺激によって、mIMCD 細胞や A549 細胞で Epo 発現は上昇しなかったが、その他 HIF 転写因子の標的遺伝子である *Hk-1* や *Glut1* の

発現は上昇していた。また、上記低酸素環境下で、各細胞株をヒット化合物と共に 24 時間培養した際の *Epo* 発現量は、ヒット化合物単独処理した際の *Epo* 発現量と同程度であった。よって、ヒット化合物群は、REPs 等における低酸素刺激を介した HIF 転写因子群による *Epo* 発現誘導とは異なる分子機構で、*Epo* 発現の誘導を行うと考えられる。

さらに、得られたヒット化合物が個体レベルで、異所性 *Epo* 発現を誘導するか解析するため、ICR マウスへの投与試験を実施した。ヒット化合物 A をマウス個体に投与し、投与後 14 時間と 20 時間で、腎臓と肺の組織を抽出し、各組織における *Epo* 発現を定量的 RT-PCR で定量した。結果、基剤である DMSO 投与個体と比べて、投与後 14 時間の肺、及び投与後 20 時間の腎臓において、有意に *Epo* 発現が上昇することが確認された(図2)。このとき、低酸素刺激に応答して活性化する HIF 転写因子の標的遺伝子 (*Hk-1*、*Glut1*) の発現に変化は認められなかった(図2)。これより、化合物 A による *Epo* 発現の上昇には、低酸素応答経路は関与しないことが示唆された。以上より、低分子化合物を用いた GATA 因子阻害は上皮系細胞からの異所性 *Epo* 発現を誘導することが実証された。本研究成果は、既存の *Epo* 製剤が抱える薬価や投与方法といった問題点を解決し得る、経口投与可能な低分子赤血球造血刺激因子剤の開発という新しい創薬標的を切り開くものである。

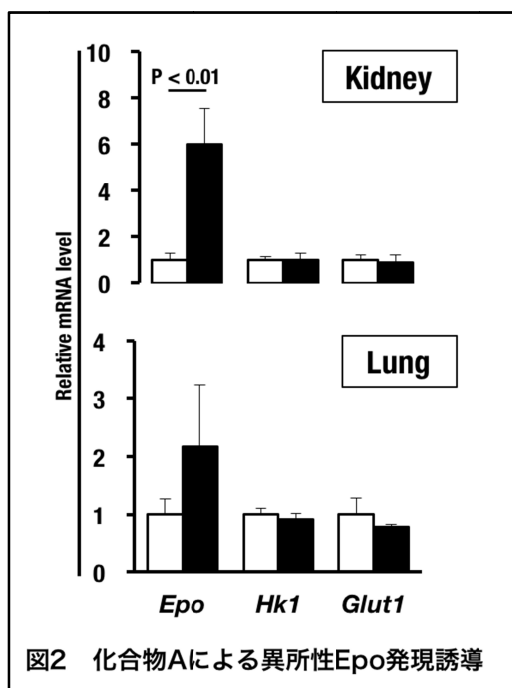


図2 化合物Aによる異所性*Epo*発現誘導

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計2件)

金子 寛、山本 雅之、清水 律子、GATA 因子阻害を起点とした異所性エリスロポエチン発現誘導剤の開発、第 81 回日本生化学会東北支部例会、2015 年 5 月 9 日、東北大学片平さくらホール(宮城県仙台市)

金子 寛、佐谷 秀行、山本 雅之、清水 律子、Derepression of GATA factor-mediated repression releases erythropoietin in non-canonical erythropoietin producing cells、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 4 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 上皮系細胞における G A T A 阻害剤及びエリスロポエチン産生誘導剤

発明者: 金子 寛、山本 雅之、清水 律子

権利者: 東北大学

種類: 特許

番号: 2015-223518

出願年月日: 2015 年 11 月 13 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 寛 (KANeko, Hiroshi)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 80635558