

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860623

研究課題名(和文)低酸素応答増強による腎エリスロポエチン産生細胞保護療法の開発

研究課題名(英文)Activating hypoxia response for improving functions of renal EPO producing cells.

研究代表者

相馬 友和 (Souma, Tomokazu)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：20722531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病は日本国民の8 - 10人に1人が罹患する国民病である。本研究では、慢性腎臓病において共通して生じる腎線維化と腎性貧血の原因と考えられている腎EPO産生細胞の生理機能低下、異常活性化を抑制する治療法の開発を目的に、腎EPO産生細胞における低酸素応答をマウスモデルを用いて検討した。腎EPO産生細胞での低酸素応答が腎障害時に抑制されていることを見だし、その増強により生理機能が保たれることを発見し得た。

研究成果の概要(英文)：This research project aimed to understand how renal erythropoietin-producing cells (REPCs) lose their physiological function and gain pathological characteristics under kidney injury. We used multiple mouse models and elucidated that the hypoxia signaling cascade is attenuated in inflammatory milieu in injured kidneys. We further found that activating hypoxia signaling by means of inhibiting HIF prolyl hydroxylase, a master negative regulatory system of hypoxia responses, restored REPCs physiological function in hypoxic injured kidneys. Our research provides an explanation how PHD inhibitors, which are clinical trial for renal anemia, might work in injured kidneys in CKD patients.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎性貧血 低酸素応答 腎エリスロポエチン産生細胞

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (Chronic kidney disease, CKD) は、国民の約 8 人に 1 人が罹患する国民病である。CKD は糖尿病性腎症、腎硬化症、糸球体腎炎など様々な原疾患で生じるが、その原因によらず腎尿細管の障害に伴う間質線維化により病状が進行していくことが知られている。病態の進展の伴い、腎で産生される造血に必須のホルモンであるエリスロポエチン (EPO) の発現低下を主な原因とする腎性貧血を合併する。CKD は、腎機能障害の初期より心血管病死増加の要因となることが明らかにされており、この貧血の合併も一因となるとされている (心-腎-貧血連関)。腎線維化の原因細胞や EPO 産生低下の機序など病態機序には不明な点が多く、腎疾患特異的な治療法開発を阻む要因となっている。それゆえ、病態解明に伴う新規標的細胞およびシグナルの同定が広く望まれている。

我々は、マウス遺伝学的手法を用いて、公立に EPO 産生細胞をリアルタイムに同定する方法を開発した。本マウスモデルにより、初めて腎 EPO 産生 (renal EPO-producing, REP 細胞) が、腎間質に広く存在する線維芽細胞様細胞であることが明らかとなった (Yamazaki, Souma, et al., Nat Commun. 2013)。また、EPO 産生は、低酸素において低酸素誘導性因子 (Hypoxia inducible factor, HIF) プロリン水酸化酵素 (prolyl hydroxylase domain-containing enzymes, PHDs, PHD1, PHD2, PHD3 の 3 つのアイソザイムが REP 細胞において主に発現している。) 活性が阻害されることで、HIF タンパク、特に HIF-2 タンパクのプロテアソームによる分解が抑制され、核移行した HIF-2 により EPO 遺伝子の転写が開始されることで主に制御されている (Haase, Am J Physiol 2010)。

我々は、REP 細胞が腎障害時には、腎線維化の原因細胞である筋線維芽細胞へと形質転換し、EPO 産生能を失うこと、同細胞が筋線維芽細胞の主要な源であること、この形質転換は腎障害早期では可逆的に回復することを明らかにしていた (Souma, et al., JASN 2013)。そして、マイクロアレイ解析を通じて、この可逆的 EP 産生抑制には NFkB シグナルが寄与することを明らかにしていた。そこで、我々は、REP 細胞の機能を保護し生理的形質を維持させることが、『腎性貧血および腎線維化の共通治療法』になると考えた。また、腎疾患時には腎内が低酸素に陥ることによって腎臓病の悪化が加速されることが知られている (Nangaku, et al JASN 2006)。ここで、急性腎障害時には尿細管細胞において低酸素応答遺伝子の発現上昇が不十分であると報告されていた (Fähling, et al. JASN 2013)。これらより、研究代表者は腎臓病では腎障害に伴い「低酸素への適応不全」が生じており、それが REP 細胞の機能不全を起こさせ、腎疾患を増悪させる要因となってい

ると考えた。そこで、REP 細胞の生理機能の主要制御系である『プロリン水酸化酵素—低酸素誘導性因子系への介入により低酸素応答を改善させれば REP 細胞機能保護につながる』と作業仮説を立てていた。

2. 研究の目的

本研究は、EPO 産生の主要制御系であるプロリン水酸化酵素—低酸素誘導性因子シグナルの介入による低酸素応答増強が REP 細胞の機能保護につながるかを、REP 細胞特異的な複合遺伝子改変マウスを用いて検討することとした。同実験を通じて、腎性貧血の合併を阻止すると共に線維化を抑制する『低酸素応答活性化による REP 細胞保護療法』の分子基盤を作出することを目的とした。

3. 研究の方法

疾患時に REP 細胞において低酸素応答不全が生じるという仮説から、同細胞における PHD-HIF シグナルの生理および病態における役割を明らかにする以下の研究を実施した。

まず、REP 細胞特異的 PHD 条件付き欠損マウスを作出した。PHD 単独欠損モデル (Epo-Cre: PHD2f/f, Epo-Cre: PHD1f/f, Epo-Cre: PHD3f/f)、および PHD 2 重欠損モデル (Epo-Cre: PHD1f/f:PHD2f/f, Epo-Cre: PHD2f/f:PHD3f/f, Epo-Cre: PHD1f/f:PHD3f/f)、さらに 3 重欠損マウス (Epo-Cre: PHD1f/f: PHD2f/f: PHD3f/f) を作製した。PHD 各アイソフォームの生理および病態における役割を検証するために、EPO 産生レベル、赤血球造血の程度を正常および腎疾患モデル (一側尿管結紮モデル) にて検討した。更に、腎内炎症シグナル、線維化の程度を同モデルで検討した。

さらに、EPO 産生細胞が GFP で標識された慢性貧血モデルマウス (Yamazaki, Souma, et al., Nat Commun. 2013) を用いて、障害腎の酸素濃度および低酸素応答について検討を行った。マイクロアレイ法を用いて網羅的な遺伝子変化を同定し、過去に報告されている HIF 標的遺伝子の貧血および腎疾患に伴う変化を詳細に検討した。その後、同定された遺伝子変化を腎障害に伴う時系列変化を検討した。さらに、多光子顕微鏡を用いて in vivo imaging を行い、腎障害時のミトコンドリア膜電位の挙動についても検討した。

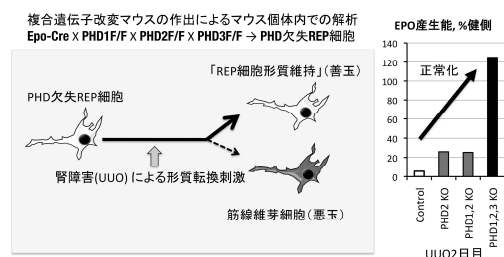
4. 研究成果

本研究により、障害腎では腎内の酸素濃度が貧血腎に比較してさらに低下することが明らかになった。低酸素濃度の悪化に関わらず、細胞の低酸素誘導因子を介した低酸素応答が全般的に低下していた。この低下は腎障害モデルにおいて継続して認められた。この全般的に低下した低酸素応答の一つとして腎エリスロポエチン産生の低下が生じていると考えられた。また、この低酸素応答の消失と同時期に、尿細管細胞のミトコンドリア膜

電位も著明に低下していることも明らかになった。

腎エリスロポエチン産生細胞において PHD 各アイソフォームを欠失させたマウスを樹立した。赤血球造血は PHD2 欠失マウスにおいて増加していた(赤血球数増加、脾臓腫大)。PHD 酵素 (PHD1, PHD2, PHD3) のうち REP 細胞においては、PHD 2 が主に機能している分子であることが判明した (PHD2 を含む欠損においてのみ多血症を示した)。

更に、腎障害時において PHD を欠失した腎エリスロポエチン産生細胞は高度に障害された腎においても EPO 産生能を喪失することなく、継続して産生できることが判明した (図)。興味深いことには、EPO 産生能は、PHD1, 3 の 2 重欠失モデルにおいても認められた。これは PHD1, 3 二重欠失モデルでは、多血症を正常で生じないため、病態特異的な応答といえる。この知見は、PHD1, 3 特異的な阻害が可能となれば、過剰な造血により多血を来すリスクが低くなるといえる。



更に、腎 EPO 産生細胞の一部において PHD1,2,3 すべてを欠失させても、腎障害に伴う炎症や腎線維化を悪化させることは無かった。この結果は、PHD 阻害は、腎臓病において、腎疾患を悪化させることなく腎性貧血の回復に有効である可能性が示された。

これらの結果をまとめて、アメリカ腎臓学会雑誌等に報告した。

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)

[雑誌論文](計 10 件)

1. Nezu M, Souma T, Yu L, Suzuki T, Saigusa D, Ito S, Suzuki N, Yamamoto M. Transcription factor Nrf2 hyperactivation in early-phase renal ischemia-reperfusion injury prevents tubular damage progression. *Kidney Int.* 2017 91(2):387-401. doi: 10.1016/j.kint.2016.08.023. 査読あり。

2. 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.* 2016; 27; 428-438.

doi: 10.1681/ASN.2014121184. 査読あり。

3. Nezu M, Souma T, Yu L, Sekine H, Moriguchi T, Takahashi N, Ito S, Suzuki N, Yamamoto M. Nrf2 DEFICIENCY ALLEVIATES PERINATAL COMPLICATIONS IN PREGNANCY-ASSOCIATED HYPERTENSION MICE VIA ENHANCING PLACENTAL ANGIOGENESIS. *J Hypertens.* 2016;34 Suppl 1 - ISH 2016 Abstract Book:e59. 査読あり。

doi: 10.1097/01.hjh.0000500005.64305.c1

4. Souma T, Tompson SW, Thomson BR, Sigs OM, Kizhatil K, Yamaguchi S, Feng L, Limviphuvadh V, Whisenhunt KN, Maurer-Stroh S, Yanovitch TL, Kalaydjieva L, Azmanov DN, Finzi S, Mauri L, Javadiyan S, Souzeau E, Zhou T, Hewitt AW, Kloss B, Burdon KP, Mackey DA, Allen KF, Ruddle JB, Lim SH, Rozen S, Tran-Viet KN, Liu X, John S, Wiggs JL, Pasutto F, Craig JE, Jin J, Quaggin SE, Young TL. Angiotensin receptor TEK mutations underlie primary congenital glaucoma with variable expressivity. *J Clin Invest.* 2016;126(7):2575-87. doi: 10.1172/JCI85830. 査読あり。

5. Liu P, Souma T, Wei AZ, Xie X, Luo X, Jin J. A Novel Method for Anti-HLA Antibody Detection Using Personalized Peptide Arrays. *Transplant Direct.* 2016 Oct 10;2(11):e109. eCollection 査読あり。

doi: 10.1097/TXD.0000000000000619

6. 相馬友和、鈴木教郎。腎線維化と腎性貧血、日本腎臓学会雑誌 2015 年、57 巻 1193-1199。査読なし。

7. Souma T, Suzuki N, Yamamoto M. Renal erythropoietin-producing cells in health and disease. *Front Physiol.* 2015; 3; 167. doi: 10.3389/fphys.2015.00167. 査読あり

8. 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* 2015; 35: 2658-2762

doi: 10.1128/MCB.00161-15. 査読あり。

9. Yu L, Moriguchi T, Souma T, Takai J, Satoh H, Morito N, Engel JD, Yamamoto M. GATA2 regulates body-water homeostasis through maintaining Aquaporin 2 expression in renal collecting ducts. *Mol*

Cell Biol; 2014: 34: 1924-1941. 査読あり。

doi: 10.1128/MCB.01659-13.

10. 柘津昌宏、相馬友和、山本雅之。腎エリスロポエチン産生細胞と腎臓病。日本臨床 2014 年、72 巻 1691-1700。査読なし。

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Nezu M, Souma T, Ito S, Suzuki N, Yamamoto M. Nrf2 activation in tubular cells prevents progression of AKI to CKD. ASN Kidney week 2015. 2015 年 11 月 18 日、San Diego, USA

2. Souma T, Nezu M, Ito S, Suzuki N, Yamamoto M. Genetic activation of hypoxia signaling restores erythropoietin synthesis in renal myofibroblasts. ASN Kidney Week 2014. 2014 年 11 月 5 日、Philadelphia, USA.

3. Souma T, Jing J, Quaggin S. Exploring the Nexus of Angiotensin-Tie2 Signaling by Mass-Spectrometry for Establishing Therapeutic Strategies for Diabetic Nephropathy. ASN Kidney week 2014. 2014 年 11 月 5 日、Philadelphia, USA.

4. 相馬友和ら。アンジオポエチン受容体 TEK の機能欠失変異は発達緑内障の原因である。日本生化学会 2016。2016 年 9 月。仙台市(仙台国際センター)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

相馬 友和 (Souma, Tomokazu)
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：20722531

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()