

平成 29 年 5 月 21 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：26860625

研究課題名(和文)腎機能保護作用を狙った腎特異的エリスロポエチン遺伝子発現誘導薬の探索

研究課題名(英文) Analysis of kidney-specific transcriptional regulation of Epo gene and establishment of mouse model of renal anemia

研究代表者

平野 育生 (Hirano, Ikuo)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00708117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓特異的なエリスロポエチン(EPO)発現誘導薬のスクリーニング系を樹立するために、Epo遺伝子の腎臓特異的な転写調節領域の詳細な解析を行った。その結果、腎臓におけるEpo遺伝子の発現制御に必須な領域として上流17.4 kbpから上流3.6 kbpの領域(CURE領域)を同定した。CURE領域を介したEpo遺伝子転写制御機構を欠損したマウスを樹立したところ、同マウスは腎性貧血と同様にEPO欠乏性の慢性貧血となることを示した。また、Epo遺伝子上流領域及びEpo遺伝子周辺領域の系統発生的に保存された領域が腎臓におけるEpo遺伝子転写制御に重要であることをマウス個体レベルで示した。

研究成果の概要(英文)：We performed transgenic reporter mouse analyses to analyze a mechanism of renal Epo gene regulation. We have found that a 13.8-kbp region (CURE region), spanning the region from 17.4 kb to 3.6 kb upstream of the Epo gene, is necessary for renal Epo gene regulation. We have also found that mice lacking the CURE region suffer from severe anemia caused by the EPO-deficiency. We named the anemic mice "AnRED (anemic model with renal EPO deficiency) mice". CURE region harbors several phylogenetically conserved elements between humans and mice (among mammals). Our results obtained by transgenic reporter mouse analyses show that these elements redundantly and cooperatively work for the regulation of Epo gene in renal EPO-producing cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：エリスロポエチン 低酸素ストレス 転写調節機構

1. 研究開始当初の背景

エリスロポエチン (EPO) は赤血球造血に必須のホルモンである。EPO の成体における主な産生臓器は腎臓であるため、慢性腎臓病などの腎臓皮質領域の線維化を伴う腎障害時には腎からの EPO 産生が障害され、EPO 欠乏性の貧血である腎性貧血となることが問題となっている。現在、腎性貧血にはリコンビナント EPO 製剤の投与がなされているが、経口投与が困難であることや抗 EPO 抗体の出現などが問題となるため、内在性 EPO 遺伝子の発現を誘導可能な低分子化合物薬の開発が期待されている。また、近年、EPO の造血外効果として、組織保護作用が報告され注目を浴びている。そのため、腎障害時に腎臓特異的な EPO 産生誘導を行うことは、腎性貧血の改善のみならず腎機能保護にも有益なものとなることが期待される。

EPO 遺伝子の転写制御機構は、EPO 遺伝子下流領域の低酸素応答性配列 (3' hypoxia responsible element, 3'HRE) を介した、転写因子 Hypoxia inducible factor (HIF) による制御が知られている。しかし、遺伝子改変マウスを用いた解析から、3'HRE を介した転写制御機構は成体肝臓における Epo 遺伝子転写制御機構には必須であるものの、腎臓における Epo 遺伝子発現制御機構には必須ではないことが示された。そのため、腎臓 EPO 産生細胞 (REP 細胞) における Epo 遺伝子の転写制御機構を解明する試みが多数行われてきたが、未だ解明には至っていない。

2. 研究の目的

本研究は、腎臓特異的な EPO 産生誘導薬の開発を目標に、REP 細胞における Epo 遺伝子転写制御機構の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) トランスジェニックマウスの樹立

個体レベルでの Epo 遺伝子の転写制御に十分な制御領域として、Epo 遺伝子転写開始点上流 60 kbp から下流 120 kbp がクロニングされた大腸菌人工染色体 (BAC) クローンを用意した (60K-BAC)。また、60K-BAC の Epo 遺伝子領域に GFP 遺伝子が挿入された BAC クローン (60K-GFP) を用意した。

60K-BAC、及び 60K-GFP を元にし、異なる長さの制御領域を持つコンストラクトを多数作成し、それぞれをトランスジーンとして用いたトランスジェニックマウスを樹立した。

Epo 遺伝子上流 17 kbp の範囲には、系統発生学的に高い保存性を示す領域が複数存在する。これらの領域のみを結合した配列を制御領域として用い、tdTomato レポーターコンストラクトを作成し、トランスジェニックマウスを樹立した。

ゲノム上の Epo 遺伝子領域に GFP 遺伝子が挿入されたアレルをヘテロで持つマウス (Epo^{wt/GFP}) を用意した。同アレルをホモでもつ個体は Epo 遺伝子のノックアウトとなり

胎生 12.5 日ごろに致死となる (Epo KO)。60K-BAC より作成されたコンストラクトをトランスジーンとして用いた樹立されたトランスジェニックマウスを Epo^{wt/GFP} と交配し、Epo KO の胎生致死性の回避を試みた。

(2) トランスジェニックマウス解析

貧血誘導は、頬静脈からの採血を 4 日間で 4~6 回行うことでヘマトクリット値 (Hct%) を 20%以下にまで下げることで行った。

免疫組織染色法 (IHC) は、凍結組織切片を作成し、抗 GFP 抗体、抗 CD73 抗体、抗 dsRed 血清を一次抗体として、Alexa488, Alexa555 などの蛍光色素が接合した抗体を二次抗体として使用し、共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察した。

血算値は、抗凝固剤として EDTA を使用し採取した末梢血を使用し、自動血球計測器により測定した。

末梢血の形態学的解析は、末梢血よりスメア標本を作成し、メイグリュンワルド・ギムザ染色、及びニューメチレンブルー染色により染色し、白血球、網赤血球をそれぞれ解析した。

赤血球の寿命の解析は、ビオチンをマウスに尾静脈投与により単回投与することで、赤血球を標識し、フローサイトメトリー解析により末梢赤血球中の標識赤血球割合を経時的に計測することで計測した。

末梢血中の EPO 濃度は、EDTA 血より調整した血漿を、抗 EPO 抗体を用いた ELISA アッセイにより解析することで計測した。

遺伝子発現解析は、各組織より調整した RNA サンプルより cDNA を作成し、定量的 RT-PCR 法により解析した。

4. 研究成果

(1) REP 細胞における Epo 遺伝子転写制御に十分な制御領域の同定

Epo 遺伝子の転写開始点上流 60 kbp から下流 120 kbp の制御領域下で GFP 遺伝子を発現するトランスジーンを持つトランスジェニックマウス (60K-GFP) (引用文献 1)、及び、上流 17 kbp から下流 15 kbp の領域下で GFP 遺伝子を発現するトランスジーンを持つトランスジェニックマウス (17K-GFP)、上流 17 kbp のみを GFP 遺伝子の制御領域として持つトランスジーンを持つトランスジェニックマウス (17KXM-GFP) をそれぞれ用意し、貧血誘導的な GFP 発現を IHC により解析を行った。その結果、60K-GFP、17K-GFP では貧血誘導的な腎臓、肝臓における GFP 発現が認められた。このことは、Epo 遺伝子の転写調節領域が、上流 17 kbp から下流 15 kbp の範囲に存在している事を示す。

17KXM-GFP は 3'HRE を制御領域として持たないため、肝臓における貧血誘導的な GFP 発現は認められなかったが、その一方で、腎臓における GFP の発現は維持されていた。この結果は、REP 細胞における Epo 遺伝子の

転写制御領域が *Epo* 遺伝子上流 17 kbp の範囲に存在することを示している (図 1)。

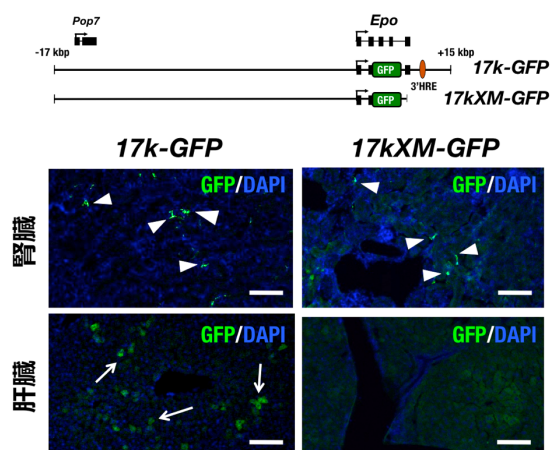


図 1 *17k-GFP*, *17kXM-GFP* の貧血ストレス下における GFP 発現 (発表論文 1 より引用)

(2) *Epo* 遺伝子上流領域中の系統発生的に保存された領域の重要性の検討

Epo 遺伝子周辺領域から上流 17 kbp の範囲には系統発生的に保存された領域が複数存在している (F1, F2, F3, F4 および 3'HRE をふくむ HE 領域)。それらの領域を PCR 法によりそれぞれ増幅し繋ぎ合わせた配列を *tdTomato* 遺伝子の制御領域として持つトランスジェニックマウス (*miniEpoHE-tdT*) を樹立し貧血誘導的なトランスジーン発現を解析した。その結果、樹立した 9 系統中、2 系統において貧血誘導的な腎臓における *tdTomato* タンパク質の発現を確認した。この結果は、REP 細胞における *Epo* 遺伝子の制御機構が、これらの系統発生的に保存された領域内に存在していることを示唆している。

miniEpoHE-tdT コンストラクトに使用した領域の内、F1 領域には RNA の成熟に関わるタンパク質をコードする *Pop7* 遺伝子が位置しており非常に高い保存性を示す領域である。また、F2 領域には、3'HRE と同様の HIF 結合配列が存在しており、この配列はヒトマウス間で保存されている (-8kHRE)。F4 領域は *Epo* 遺伝子のプロモーター周辺領域であり、*Epo* 遺伝子の転写制御には必須である。一方で、F3 領域には目立った特徴も認められない。そこで *miniEpoHE-tdT* コンストラクトより F3 領域を欠失させたコンストラクトを作成し、トランスジェニックマウスを樹立した。その結果、樹立した 5 ライン中、1 ラインにおいて貧血誘導的な腎臓における *tdTomato* タンパク質の発現が確認された。

(3) -8kHRE の機能性、及び REP 細胞における *Epo* 遺伝子転写制御機構における必要性の検討

-8kHRE は、その配列が 3'HRE に似ているだけでなく、EPO 産生能を持つ肝癌由来細胞株 Hep3B を用いたレポーターアッセイの結果から HRE としての機能性が -8kHRE にあ

ることが示されており、REP 細胞における *Epo* 遺伝子のエンハンサーなのではないかと期待されていた (引用文献 2)。我々の解析においても -8kHRE は低酸素ストレス誘導的な転写活性化能を示すことが確認されていた (図 2)。

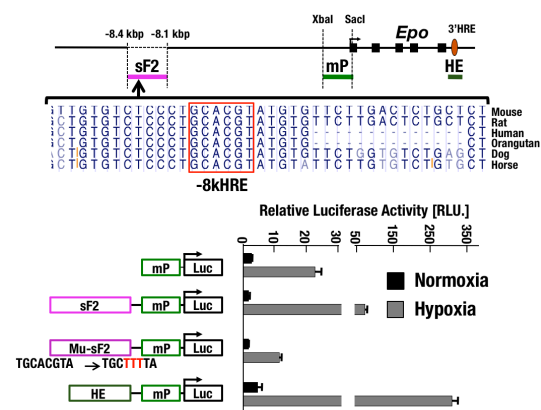


図 2 Hep3B 細胞株を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイ (発表論文 1 より引用)

そこで、Hep3B 細胞株を用いたレポーターアッセイで低酸素ストレス誘導的な転写活性化能が確認できた制御領域下で *GFP* 遺伝子を発現するコンストラクトを作成し、トランスジェニックマウス解析を行った。しかし、樹立した全てのライン (4 ライン) において、貧血誘導的なレポータータンパク質の発現は認められなかった。また、-8kHRE の必要性を個体レベルで示すことを目的に、-8kHRE を含む領域を 60K-GFP より欠失させたコンストラクトを作成し、トランスジェニックマウスを樹立したが、予想に反し、樹立した 2 ライン中 1 ラインにおいて貧血誘導的な腎臓における GFP 発現が認められた。これらの結果は、-8kHRE は低酸素ストレス誘導的な転写活性化能を持った機能的な HRE であるが、腎臓における *Epo* 遺伝子転写制御機構として -8kHRE 領域単独では十分でなく、また、必須でもないことを示している。

(4) REP 細胞における *Epo* 遺伝子制御に必須な領域の同定

Epo 遺伝子上流 17 kbp の範囲に REP 細胞における *Epo* 遺伝子の制御領域が存在することや、同領域中の系統発的に保存された領域にその制御に重要な因子が隠されていることは示せたが、実際にこれらの領域が REP 細胞における *Epo* 遺伝子の転写制御に必須であるかは不明であった。そこで、60K-GFP より F1 から F3 領域を含む領域、conserved upstream element for renal *Epo* regulation (CURE) 領域を欠失させたコンストラクトを作成し、トランスジェニックマウスラインを樹立した (*dCURE-GFP*)。樹立した 7 系統のうち、390 系統は貧血ストレス誘導的な肝臓及び脳における GFP 発現を認めた。その一方で、腎臓においては貧血ストレス下であ

でも GFP 発現は認められなかった (図 3)。390 系統以外の系統は、貧血ストレス下であろうと腎臓肝臓における GFP 遺伝子の発現、及び GFP タンパク質の発現が認められなかった。

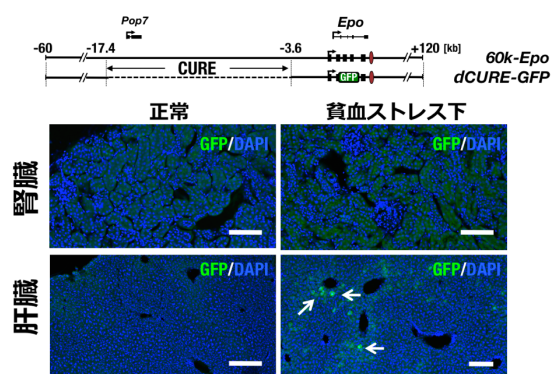


図 3 *dCURE-GFP*における貧血ストレス誘導的な GFP 発現 (発表論文 1 より引用)

390 系統の結果は、REP 細胞が、他の EPO 産生細胞とは全く異なる転写制御機構により *Epo* 遺伝子を制御していることを示唆しており、また、その制御に CURE 領域が必須であることを示唆している。

(5) CURE 領域欠損による胎仔期 EPO 産生細胞における *Epo* 遺伝子転写制御機構への影響の検討

我々は過去に、EPO は成体における赤血球造血だけでなく、発生期における正常な一次造血及び二次造血においても必須であることを示している (引用文献 3)。

この胎仔期の *Epo* 遺伝子の転写制御機構も 3'HRE によらない制御機構を持っていることから、REP 細胞と同様の *Epo* 遺伝子の転写制御機構を利用している可能性があった。そこで *dCURE-GFP* Line 390 の胎仔期 EPO 産生細胞に対し IHC による GFP 発現解析を行った。その結果、予想とは異なり、胎仔期 EPO 産生細胞における GFP タンパク質の発現が認められた。

この結果は、胎仔期 EPO 産生細胞における *Epo* 遺伝子転写制御機構も REP 細胞における *Epo* 遺伝子転写制御機構とは異なることを示し、また、*dCURE-GFP* に用いた制御領域内に胎仔期の *Epo* 遺伝子転写制御機構が含まれていることを示す。

(6) 腎性貧血モデルマウスの樹立

dCURE-GFP を用いた解析結果より、CURE 領域を欠失させることで REP 細胞における *Epo* 遺伝子の転写制御のみを障害することが可能だと考えられた。そこで、60K-Epo より CURE 領域を欠失させたコンストラクトを作成し、トランスジェニックマウスを樹立した (*dCURE-Epo*)。過去に報告した、3'HRE 領域を含む *Epo* 遺伝子の周辺領域のみをトランスジーンとして用いたトランスジ

ェニックマウスでは、樹立したほぼ全てのラインで多血症を示した。そのため、*dCURE-Epo* も多血症となることが予想されたが、樹立した全てのラインで正常な血算値を示した。*Epo* 遺伝子には正の制御だけでなく、過剰に発現しないように負に制御する機構が存在しており、*dCURE-Epo* コンストラクトには、この負の制御機構が残っていることが予想された。

dCURE-Epo と *Epo^{wt/GFP}* の交配を重ねることにより *Epo* 遺伝子破壊による胎生致死の回避を試みたところ、4 ラインにおいてレスキュー個体 (*dCURE-Epo::Epo^{GFP/GFP}*) が得られた。興味深いことに得られたレスキュー個体は、どのラインにおいても成体で重度の貧血を示すことがわかった (図 4)。重度の貧血にも関わらず、レスキュー個体の末梢血中の EPO タンパク質量は低値を示し、網赤血球割合も低値を示した。その一方で、赤血球寿命や MCV 値、MCHC 値は正常値を示し、形態学的にも異常は認められなかった。これらの結果は、レスキュー個体が発症する貧血は、赤血球分化の異常などが原因ではなく、EPO 欠乏が原因となった貧血であることを示す。qRT-PCR による解析の結果、これらのレスキュー個体では貧血ストレスによって誘導されるべき腎臓における *Epo* 遺伝子の転写誘導が消失していることが示された。そのため我々は、このマウスを腎性貧血のマウスモデルとして、Anemic model with renal EPO deficiency (AnRED) マウスと名付けた。

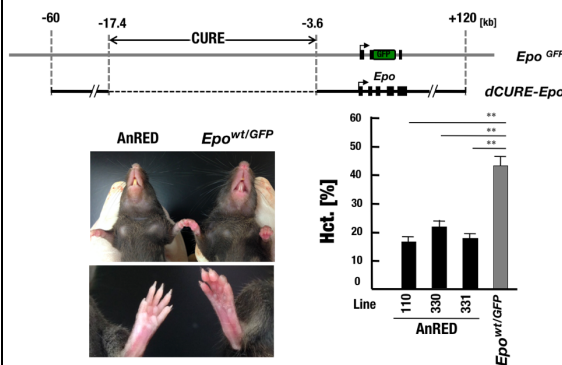


図 4 AnRED マウスは EPO 欠乏により、慢性的な重度貧血を示す。(発表論文 1 より引用)

(7) 結果の総括と今後の展望

これまで-8kHRE 周辺の領域が REP 細胞における *Epo* 遺伝子の制御領域ではないかと期待されていたが、これまで個体レベルでは検証されていなかった。本研究においても細胞株を用いた解析で-8kHRE に低酸素ストレス誘導的な転写活性化能を認めたが、個体レベルでは *Epo* 遺伝子の転写制御に必須でも十分でもないことが示唆された。おそらくは、REP 細胞における *Epo* 遺伝子の転写制御機構は互いに代償可能な複数のエレメントにより複合的に制御されており、単一のエンハンサーを同定するのは困難であることが予想さ

れる。

一方で、REP 細胞は他の EPO 産生細胞とは異なる *Epo* 遺伝子転写制御機構を持っており、CURE 領域がその制御機構に必須であることを示した (図 5)。

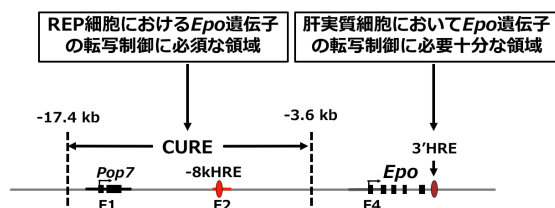


図 5 REP 細胞と肝実質細胞は異なる制御領域を用いて *Epo* 遺伝子を制御している。

本研究で樹立した AnRED マウスは慢性的な重度の貧血を示し、個体内の EPO 産生細胞は EPO の代わりに GFP を発現しているため、容易に同定が可能である。近年、リコンビナント EPO 製剤に変わる erythropoiesis stimulating agent (ESA) の開発が進められているが、AnRED マウスは新規 ESA の探索及び効果の検討、薬効機序の解明に用いるのに適したモデルマウスである。

<引用文献>

1. Obara N, Suzuki N, Kim K, et al. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood* 2008, 111: 5223–5232.

2. Storti F, Santambrogio S, Crowther LM, et al. A novel distal upstream hypoxia response element regulating oxygen dependent oxygen dependent erythropoietin gene expression. *Haematologica* 2014, 99: e45-e48.

3. Suzuki N, Hirano I, Pan X, et al. Erythropoietin production in neuroepithelial and neural crest cells during primitive erythropoiesis. *Nat Commun* 2013, 4:2902.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Hirano I, Suzuki N, Yamazaki S, Sekine H, Minegishi N, Shimizu R, Yamamoto M. Renal Anemia Model Mouse Established by Transgenic Rescue with an Erythropoietin Gene Lacking Kidney-Specific Regulatory Elements. *Mol Cell Biol*. 2017 Feb 1;37(4). pii: e00451-16. doi: 10.1128/MCB.00451-16. (査読あり)

2. 平野 育生, 山本 雅之. 低酸素ストレスに対する生体応答機構. *ファルマシア*, 2017,

53(3), 201-5. (査読あり)

3. 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 Feb;27(2):428-38. (査読あり)

4. 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 Aug;35(15):2658-72. (査読あり)

5. Yamamoto M, Hirano I. Identification of erythropoietin producing cells and erythropoietin gene regulation. *Rinsho Ketsueki*. 2014 Oct;55(10):1785-94. (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

1. 第 25 回 腎とエリスロポエチン研究会、「腎臓におけるエリスロポエチン遺伝子発現制御機構の解明」、平野育生、鈴木教郎、清水律子、山本雅之、2016 年 11 月 5 日、品川プリンスホテル (東京)

2. 酸素生物学・ダイニングコード合同若手会議、「エリスロポエチン遺伝子制御領域の同定および同領域を利用した腎性貧血モデルマウスの樹立」、平野育生、2016 年 1 月 26-28 日、一宮シーサイドオーツカ (千葉)

3. BMB2015、「エリスロポエチン遺伝子の腎特異的転写制御領域の解析と腎性貧血モデルマウスの樹立」、平野育生、鈴木教郎、柘津昌広、関根弘樹、相馬友和、峯岸直子、清水律子、山本雅之、2015 年 12 月 1-4 日、神戸ポートアイランド (神戸)

[その他]

東北大学プレスリリース
<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2017/01/press20170105-01.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 育生 (HIRANO, Ikuo)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 00708117