

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19416

研究課題名(和文) 上皮系細胞で低酸素非応答的に産生されるエリスロポエチンの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Erythropoietin that is produced in epithelial cells independently of hypoxic stimuli

研究代表者

清水 律子(Shimizu, Ritsuko)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40226262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：上皮系細胞においてEpo遺伝子発現を恒常的に抑制しているGATA転写因子に着目し、GATA因子が結合するシス制御領域を欠失したマウス2系統を樹立した。同変異をヘテロにもつマウスはメンデル則に合致して出生し成長した。この変異によりGATA因子によるEpo遺伝子発現抑制が行われず、恒常的にEPOが産生されることを予想していたが、ヘテロマウスの血算は同腹野生型マウスと比較して優位な変化はなかった。また、上皮系細胞でのEpo遺伝子発現の変化を定量的PCR法で検討したが、同腹野生型マウスと比較して優位な変化はなかった。今後は、ホモマウスを樹立して血算やEpo遺伝子の発現を検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、低酸素誘導因子(HIF)の安定化を目的としたプロリン水酸化酵素阻害剤が開発され、検証的臨床試験の結果からある程度の貧血改善が得られることが明らかにされた。しかし、既に低酸素に晒されているにもかかわらずEPO産生能が低下している腎性貧血患者のEPO産生細胞に、さらに疑似低酸素状態(HIFの安定化)を増強させることで、どの程度の治療効果が得られるかが疑問視されている。また、全身性のHIF安定化による危険性を懸念する研究者も多い。以上のことから、腎性貧血患者において障害を受けていない上皮系細胞に焦点を当てた本研究は臨床的応用可能な治療薬創出につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We focused on a GATA-binding motif within the Epo gene promoter-proximal region, which is involved in constitutive suppression of Epo gene expression in epithelial cells in mice. We have established two lines of mice carrying an allele that was deleted for the GATA-binding motif by means of Crispr/Cas9 system. The heterozygous mice could be born alive with the expected Mendelian frequency and seemed to grow up normally. We have expected that Epo gene expression is constitutively activated in the heterozygous mice, however, the mice showed no remarkable changes in the hematopoietic indices. In addition, the expression of Epo gene in the lung epithelial cells was not activated in the heterozygous mice. We are planning to examine the hematopoietic indices and Epo gene expression in the epithelial cells of mice carrying homozygous deletion of the GATA-binding motif.

研究分野：分子生物学分野

キーワード：エリスロポエチン 腎性貧血 創薬

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

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必須の造血因子である。胎生期では、造血が行われる胎児肝臓で EPO を産生することにより、効率的なパラクリン制御で発生成長期の赤血球造血を促進している。一方、出生後は、低酸素 (貧血) を感知しやすい腎臓間質細胞で EPO を産生することで、多種多様の血球を均衡よく産生する骨髓造血の調節に寄与している。申請者らは、胎児肝臓と成体腎臓での EPO 遺伝子発現はいずれも低酸素応答性制御を受けるが、胎児肝臓では EPO 遺伝子下流の領域が、腎臓では EPO 遺伝子上流の領域が、それぞれの組織特異的な遺伝子発現に重要であることを明らかにしてきた (図1の上段と中段)¹⁾。すなわち、発生時および出生後の赤血球造血の恒常性は、適所適時に適量の EPO を産生する厳密な制御により維持されている。

腎性貧血は腎 EPO 産生細胞が器質的に障害されて低酸素に反応できない病態と定義される。従って、腎性貧血の治療にはリコンビナント EPO 製剤の補充投与が第一選択とされている。しかし、リコンビナント製剤は高価であること、また、抗体産生等による治療困難症例もあることから、低分子腎性貧血治療薬の開発が期待されている。近年、低酸素誘導因子 (HIF) の安定化を目的としたプロリン水酸化酵素阻害剤が開発され、検証的臨床試験の結果から腎機能障害を持つ患者においてある程度の貧血改善が得られることが明らかにされた。しかし、既に低酸素に晒されているにもかかわらず EPO 産生能が低下している腎性貧血患者の EPO 産生細胞に、さらに疑似低酸素状態 (HIF の安定化) を増強させることで、どの程度の治療効果が得られるかが疑問視されている。また、全身性の HIF 安定化による危険性を懸念する研究者も多い。以上のことから、低酸素応答因子を標的とした EPO 産生誘導剤には限界がある。

申請者らは、子宮筋腫や種々の悪性腫瘍において異所性 EPO 産生を随伴する症例が散見されること、および、上皮系細胞においては、GATA 転写因子が、EPO 遺伝子転写開始点直上流の GATA 因子結合配列を介して EPO 遺伝子の活性化を抑制している可能性を示唆する報告 (図1の下段)²⁾に着目し、GATA 転写因子の機能を抑制することによる異所性 EPO 誘導剤の創出を試みた。その過程で、ミトキサントロンが GATA2 の発現を抑制し、上皮系細胞由来の細胞株や、マウス肺上皮および腎尿細管上皮細胞において EPO 遺伝子の発現を誘導できることを見いだした^{3,4)}。この成果は、上皮系細胞からの異所性 EPO 産生誘導が、障害腎からの EPO 産生を期待できない腎性貧血患者に対して、リコンビナント EPO 製剤補充療法に換わる治療ストラテジーとなり得ることを示している。異所性 EPO 産生に着目した創薬研究は、申請者オリジナルの着想であり、国内外を含めて全く例がない。「EPO は低酸素に反応して腎臓から産生される」という固定概念を覆す、EPO 研究におけるパラダイムシフトとなる可能性を持つと考えている

<参考文献>

¹⁾Hirano I et al, Renal anemia model mouse established by transgenic rescue with an erythropoietin gene lacking kidney-specific regulatory elements. *Mol Cell Biol*, 37, e00451-16, 2017

²⁾Obara N et al, Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood*, 111, 5223-32, 2008

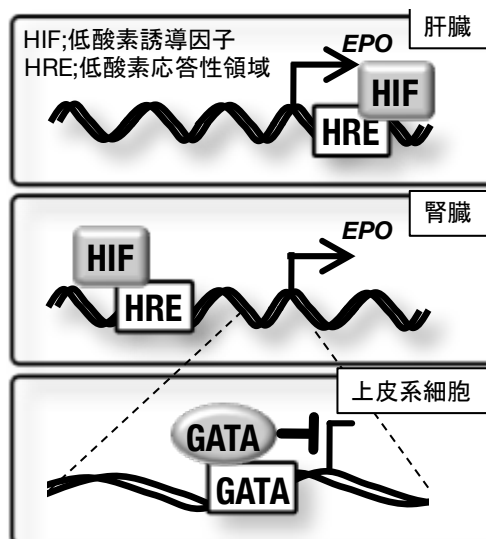
³⁾Yu L et al, Reducing inflammatory cytokine production from renal collecting duct cells by inhibiting GATA2 ameliorates acute kidney injury. *Mol Cell Biol*, 37, e00211-17, 2017

⁴⁾Kaneko et al, Induction of erythropoietin gene expression in epithelial cells by chemicals identified in GATA inhibitor screenings. *Gene Cells*, 22, 939-52, 2017

2. 研究の目的

本申請課題では、EPO 産生能を持つが休止している上皮系細胞から異所性に産生される EPO がエンドクリン制御による骨髓造血機能を保持することを明らかにする。また、EPO の造血外効果として知られている組織保護作用の有無についても検討する。EPO は、転写翻訳されたあとにジスルフィド結合や糖鎖付加などの翻訳後修飾を受けて、安定で機能的、また、ホルモンとして生体内移動が可能になることが分かっている。従って、異所性に産生される EPO タンパク

図1 組織特異的 EPO 遺伝子制御



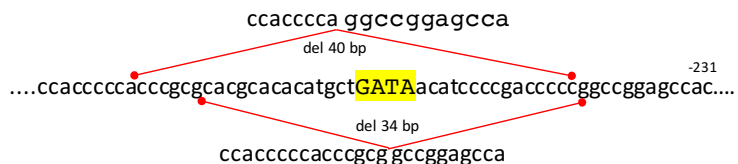
質と腎臓で産生される EPO タンパク質の機能的異同を明らかにする。

3. 研究の方法

CRISPR-Cas9 法を用いてマウスゲノムの GATA 結合配列を削除したマウスを作成し、マウス個体内で低酸素非応答的に赤血球造血に寄与する EPO 産生が得られるかを検討する。

4. 研究成果

図2 樹立したマウス系等が保持する *Epo* 遺伝子プロモーター領域の変異



- (1) *Epo* 遺伝子上流の GATA 結合配列を含む 34bp、および、40bp の配列を除去した 2 系統のマウスを樹立した (図2)。
- (2) ヘテロマウスは雌雄ともメンデル則に合致して出生し、成熟した。
- (3) ヘテロマウスの血算を測定したが、同腹子と比べて異常は示さなかった。
- (4) ヘテロマウスの肺上皮細胞を用いて *Epo* 遺伝子の発現を検討したが、同腹子と比較して異常を示さなかった。
- (5) 今後はホモマウスの作出や、ストレス付加 (低酸素や組織障害) などの刺激を行い、上皮系からの *Epo* 遺伝子発現の有無を確認する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Moriguchi T, Hoshino T, Rao A, Yu L, Takai J, Uemura S, Ise K, Nakamura Y, Lim KC, Shimizu R, Yamamoto M, Engel JD.	4. 巻 38
2. 論文標題 A Gata3 3' distal otic vesicle enhancer directs inner ear-specific Gata3 expression.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Cell Biol	6. 最初と最後の頁 e00302-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MCB.00302-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Harada N, Hasegawa A, Hirano I, Yamamoto M, Shimizu R	4. 巻 110
2. 論文標題 GATA2 hypomorphism induces chronic myelomonocytic leukemia in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 1183-1193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13959	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saito K, Fujiwara T, Hatta S, Morita M, Ono K, Suzuki C, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Kawamata S, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H.	4. 巻 39
2. 論文標題 Generation and Molecular Characterization of Human Ring Sideroblasts: a Key Role of Ferrous Iron in Terminal Erythroid Differentiation and Ring Sideroblast Formation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Cell Biol	6. 最初と最後の頁 e00387-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MCB.00387-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu R, Yamamoto M.	4. 巻 72
2. 論文標題 Quantitative and qualitative impairments in GATA2 and myeloid neoplasms.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IUBMB LIFE	6. 最初と最後の頁 142-150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/iub.2188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shimizu R, Harada N, Hasegawa A, Hirano I, Yamamoto M.
2. 発表標題 Yamamoto M. GATA2 hypomorph triggers chronic myelomonocytic leukemia in mice.
3. 学会等名 IUBMB Focused Meeting on GATA Transcription Factors. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水律子
2. 発表標題 GATA1転写因子の機能異常と白血病
3. 学会等名 第19回細胞移植・遺伝子治療セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森口尚、于磊、金子寛、山本雅之、清水律子
2. 発表標題 転写因子GATA2によるサイトカイン産生亢進を介した腎臓での炎症促進メカニズム
3. 学会等名 第91回生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田優城、長谷川敦史、平野育生、清水律子
2. 発表標題 DCML欠損症発症に関与する変異GATA2の分子機能解析
3. 学会等名 第91回生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川敦史, 藤田優旗, 山本雅之, 清水律子
2. 発表標題 GATA2による系列特異的な免疫細胞産生制御
3. 学会等名 第91回生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五十嵐友哉, 平野育生, 佐々木瞳, 清水律子
2. 発表標題 赤芽球性白血病発症機序における転写因子GATA1の役割
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第85回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田伸彦, 藤田優城, 長谷川敦史, 清水律子
2. 発表標題 GATA2 hypomorph induces chronic myelomonocytic leukemia in mice
3. 学会等名 第23回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野育生, 長谷川敦史, 金子寛, 加藤剛英, 山本雅之, 清水律子
2. 発表標題 低酸素非依存性のエリスロポエチン産生を異所的に誘導する化合物の探索
3. 学会等名 第7回 低酸素研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川敦史, 竹中佑太, 保坂優奈, 山本雅之, 清水律子
2. 発表標題 GATA2による系列特異的な免疫細胞産生制御.
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Igarashi T, Hirano I, Sasaki H, Shimizu R. Analysis of mechanism of erythroblastic leukemia by GATA1 knockdown
2. 発表標題 Analysis of mechanism of erythroblastic leukemia by GATA1 knockdown.
3. 学会等名 Tohoku Forum for Creativity "Cancer - from Biology to Acceptance" (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平野育生, 田宮元, 佐々木瞳, 田高周, 鈴木美野里, 後藤あや, 元池育子, 木下賢吾, 山本雅之, 清水律子
2. 発表標題 マウス白血病発症モデルを用いた赤白血病発症に影響を与える遺伝的素因の探索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----