

## 慢性腎臓病における腎間質線維芽細胞の変容機序の解明

東北大学 未来科学技術共同研究センター 酸素代謝制御プロジェクト  
鈴木 教郎

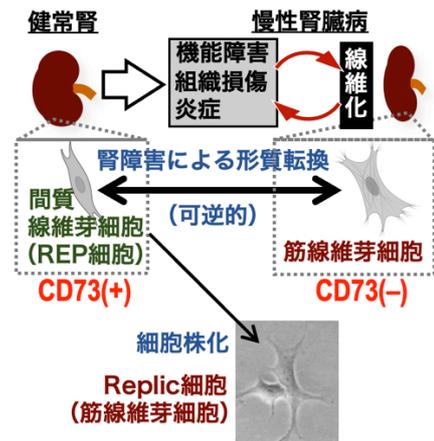
### 〔概要〕

慢性腎臓病（CKD）は効果的治療法が確立されておらず、患者数は増加の一途を辿っている。CKDの成因や病態は多様であるが、慢性期には共通して腎臓間質の線維芽細胞から筋線維芽細胞が出現・増殖し、線維化が進行する。腎線維化の進行は腎機能低下と相関することから、線維化の解消や抑制が慢性腎臓病に対する治療戦略として有効であると考えられている。我々は、マウス腎臓の筋線維芽細胞株「Replic細胞」を樹立し、Replic細胞のなかには線維芽細胞の性質を保持している集団が存在しており、細胞表面に線維芽細胞マーカーであるCD73を発現していることを見出した。また、CD73陰性Replic細胞がCD73陽性細胞へと脱分化する培養条件を確立した。そこで本研究では、マウス全遺伝子に対するRNA干渉ライブラリーをCD73陰性Replic細胞に導入し、CD73陽性細胞への脱分化誘導に関連する遺伝子を探索した。その結果、RNA干渉ライブラリーの導入によって出現したCD73陽性細胞からゲノムDNAを抽出し、RNA干渉の標的遺伝子を解析したところ、1つの分子経路に関連する4つの遺伝子が同定された。また、これらの遺伝子の発現抑制により、細胞外基質や線維化の促進に関連する遺伝子の発現レベルが低下することを確認した。以上の結果から、今回同定した遺伝子および分子経路が腎線維化に深く関与しており、腎線維化ひいてはCKDの治療標的となることが示された。

### 〔背景・経緯〕

現在、慢性腎臓病（CKD）の患者数は世界人口の1割を超えており、増加の一途を辿っている。しかし、CKDの成因や病態は複雑であり、効果的治療法が確立されていない。そのため、血液透析などの高額な対症療法に頼らざるを得ず、CKDは各国で医療費高騰の主因になっている。CKDの分子病態解明は医学的・社会的に喫緊の課題である。CKDの病因や病態は多岐にわたるが、共通して腎臓間質に筋線維芽細胞が出現し、線維化が進行することから、腎線維化機序の解明がCKDの分子病態理解への突破口となると考えられている。

我々は、遺伝子改変マウスの樹立と解析を通して、赤血球造血因子エリスロポエチン（EPO）を産生する腎間質線維芽細胞（renal EPO producing cell: REP細胞）が腎障害により筋線維芽細胞に形質転換することを示した。加えて、腎障害の軽減によって筋線維芽細胞が元のREP細胞の性質を取り戻す（脱分化）することを発見し、腎線維化の可塑性を明らかにした（*Nakai et al., Blood Adv 2023; Nakai et al., Biochem Pharmacol 2022; Miyauchi et al., EBioMedicine 2021; Suzuki et al., Kidney Int 2018; Souma et al., J Am Soc Nephrol 2013, 2016*）。また、マウスREP細胞由来の筋線維芽細胞株であるReplic（REP-cell lineage immortalized and cultivable）細胞を樹立し、Replic細胞を線維芽細胞に脱分化させる培養条件を確立した（*Sato et al., Sci Rep 2019; Iwamura et al., Mol Cell Biol 2025*）。

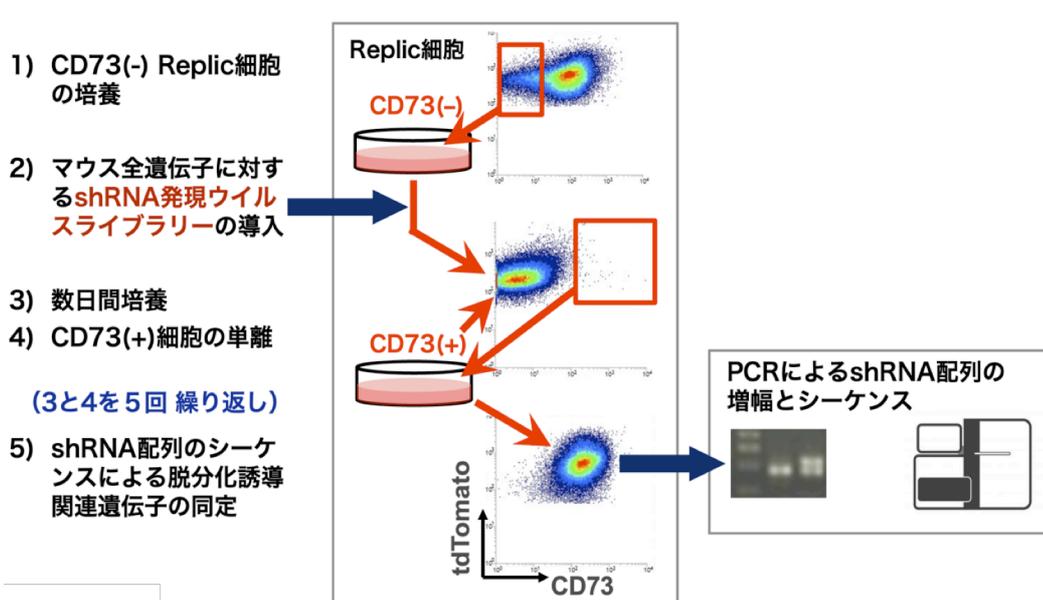


### 〔目的〕

CKDの分子病態理解と革新的治療法の開発につながる成果を得るために、Replic細胞の脱分化誘導系を応用し、Replic細胞がREP細胞の性質を再獲得する際に機能する遺伝子の網羅的探索を実施した。得られた成果から、腎線維化治療の標的となる分子および分子経路の同定を試みた。

## [方法]

Replic細胞は、単一のREP細胞由来の細胞株であり、マウス腎臓から単離したREP細胞に変異型*HRAS*遺伝子を導入することにより不死化されている (Sato *et al.*, *Sci Rep* 2019)。培養には、血清を10%含むDMEM培地 (ナカライテスク) を用いた。フローサイトメトリーと細胞分取は、抗CD73抗体 (BioLegend Cat# 212720) を用いて細胞を染色し、FACS JazzまたはFACS Melodyセルソーター (ベクトンディッキンソン) にて実施した (Nakai *et al.*, *STAR Protoc* 2021)。定量的RT-PCR解析のために、培養した細胞からISOGEN (ニッポンジーン) を用いてRNAを抽出し、SuperScript IV (Thermo Fisher) を用いた逆転写反応によってcDNAを合成した。cDNAをSYBR Greenマスターミックス (Roche) を用いた定量的PCR解析 (LightCycler, Roche) に供し、遺伝子発現量を解析した。脱分化誘導関連遺伝子の探索のために、レンチウイルスにパッケージングされたマウス遺伝子に対するshRNAライブラリー (Vector Builder) をポリブレンを用いてReplic細胞に導入した。培養細胞のゲノムDNAは、細胞をプロテイナーゼ処理した後にフェノール・クロロホルム抽出によって精製した。ゲノムDNA中のshRNA配列のPCR増幅には、AmpliTaq Gold (Thermo Fisher) を用いた。全PCR産物の配列を解読するために、日本ジェネティクス社にAmpliconシーケンスを委託した。



## [結果]

Replic細胞は、蛍光タンパク質tdTomatoをREP細胞において恒常的に発現する遺伝子改変マウスから単離したREP細胞に由来するため、すべての細胞が赤色蛍光を発現する (上図: Sato *et al.*, *Sci Rep* 2019; Nakai *et al.*, *STAR Protoc* 2021; Yamazaki *et al.*, *Nat Commun* 2013)。また、通常の培養条件では、CD73陰性Replic細胞がCD73を再発現することはないが、CD73陰性Replic細胞を特殊な環境で培養するとCD73陽性の線維芽細胞に脱分化する。そこで、CD73陰性Replic細胞にマウスshRNAライブラリーを発現するレンチウイルスを感染させたところ、少数のCD73陽性細胞が出現した。次に、CD73を再発現したReplic細胞を単離・培養したところ、安定的にCD73を発現するReplic細胞が得られた (上図)。

CD73を再発現したReplic細胞に導入されたshRNAを同定するために、shRNAライブラリー導入後に単離と培養を繰り返したCD73陽性Replic細胞からゲノムDNAを精製した。得られたゲノムDNAを鋳型として、ウイルスベクター配列に相当するプライマーを用いたPCRを行い、CD73再発現細胞に導入されたウイルスベクター中のshRNA配列を増幅し、Ampliconシーケンスに供した (上図)。

独立した2回の実験におけるAmpliconシーケンスの結果から、数個の遺伝子のみがReplic細胞のCD73再発現に関与することが示された (右表)。遺伝子の機能について文献に基づいて調査したところ、実験回によって同定された遺伝子は異なるものの、右表のいずれの遺伝子も1つの分子経路に関連することがわかった。

		頻度
実験1	Gene1	87%
実験2	Gene2	40%
	Gene3	32%
	Gene4	28%

ライブラリーから得た結果を確認するために、4つの遺伝子に対する特異的なshRNAを単独でReplic細胞に導入した。shRNAの導入から72時間後に定量的RT-PCRを実施したところ、細胞外基質などの線維化関連遺伝子の発現レベルが各shRNA導入によって低下することが示された。

## [考察・展望]

本研究では、独自開発したReplic細胞の性状解析を実施し、Replic細胞が腎線維化関連遺伝子の探索に有効であることを示した。本研究により同定した分子経路は、これまでに腎線維化との関連が知られていないため、新規性の高い成果を得たと考えられる。今後、本研究で確立した遺伝子探索と同定した候補遺伝子の機能解析を進めることにより、腎線維化の分子病態解明を目指す。腎線維化の治療標的を同定することは、アンメットメディカルニーズの高い慢性腎臓病の理解につながる。

## [謝辞]

探索的解析にとりくむにあたり、本助成が心強い後押しとなりました。感謝申し上げます。また、本研究の協力者である東北大学大学院医学系研究科酸素医学分野のメンバーにお礼申し上げます。

## [関連論文]

- Iwamura Y, Nakai T, Kato K, Ishioka H, Yamamoto M, Hirano I, Suzuki N. Erythropoietin production in embryonic neural cells is controlled by hypoxia signaling and histone deacetylases with an undifferentiated cellular state. *Mol Cell Biol* 45(1), 32–45, 2025 財団への謝辞あり
- Suzuki N, Iwamura Y, Kato K, Ishioka H, Konta Y, Sato K, Uchida N, Koida N, Sekine H, Tanaka T, Kumagai N, Nakai T. Crosstalk between oxygen signaling and iron metabolism in renal interstitial fibroblasts. *J Clin Biochem Nutr* 74(3), 179–184, 2024 財団への謝辞あり
- Nakai T, Iwamura Y, Kato K, Hirano I, Matsumoto Y, Tomioka Y, Yamamoto M, Suzuki N. Drugs activating hypoxia-inducible factors correct erythropoiesis and hepcidin levels via renal EPO induction in mice. *Blood Adv* 7 (15), 3793–3805, 2023
- Nakai T, Saigusa D, Iwamura Y, Matsumoto Y, Umeda K, Kato K, Yamaki H, Tomioka Y, Hirano I, Koshiba S, Yamamoto M, Suzuki N. Esterification promotes the intracellular accumulation of roxadustat, an activator of hypoxia-inducible factors, to extend its effective duration. *Biochem Pharmacol* 197, 114939, 2022
- Miyauchi K, Nakai T, Saito S, Yamamoto T, Sato K, Kato K, Nezu M, Miyazaki M, Ito S, Yamamoto M, Suzuki N. Renal interstitial fibroblasts coproduce erythropoietin and renin under anaemic conditions. *EBioMedicine* 64, 103209, 2021
- Nakai T, Iwamura Y, Suzuki N. Efficient isolation of interstitial fibroblasts directly from mouse kidneys or indirectly after ex vivo expansion. *STAR Protoc* 2, 100826, 2021
- Sato K, Hirano I, Sekine H, Miyauchi K, Nakai T, Kato K, Ito S, Yamamoto M, Suzuki N. An immortalized cell line derived from renal erythropoietin-producing (REP) cells demonstrates their potential to transform into myofibroblasts. *Sci Rep* 9, 11254, 2019
- Suzuki N, Matsuo-Tezuka Y, Sasaki Y, Sato K, Miyauchi K, Kato K, Saito S, Shimonaka Y, Hirata M, Yamamoto M. Iron attenuates erythropoietin production by decreasing HIF2a concentrations in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int* 94 (5), 900–911, 2018
- 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 (2), 428–438, 2016.
- 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 (10), 1599–1616, 2013
- 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. *Nat Commun* 4, 1950, 2013