

異所性エリスロポエチン誘導剤の開発

東北大学大学院医学系研究科分子血液学分野

清水 律子

1. 目的

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、効率的なパラクライ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髄造血の調節に寄与している。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^{1,2)}。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にしたEPO産生誘導療法には限界があると考えられる。

本研究では、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³⁾に着目し、EPO産生能を持つが休止している上皮系細胞からEPO産生を促すGATA因子阻害剤を開発し、新たな腎性貧血治療薬創出における基礎研究を行うことを目的とする。

2. 方法

上皮系細胞から異所性にEPOを誘導できる陽性コントロールや、スクリーニングに適当は上皮系細胞株に関する情報が全く無かったので、第一段階としてGATA因子阻害剤を選出し、第二段階で種々の上皮系細胞でのEPO遺伝子発現効果を検討するという2段階のスクリーニングを行った。得られた化合物に対して、種々の細胞株を用いてEPO誘導活性を、通常酸素濃度下および低酸素環境で測定し、低酸素応答性EPO発現制御機構との関連性を検討した。また、マウスへの投与を行い、動物個体内でのGATA因子阻害活性及びEPO誘導能を検討した。さらに、既存のGATA因子阻害剤では上皮系細胞からEPO発現を誘導できないことが分かっていたので、低酸素応答的なEPO転写制御と上皮系細胞におけるEPO転写制御を比較した。

3. 研究成果

1) EPO誘導活性をもつ化合物の同定

まず、GATA因子抑制効果を持つ化合物を得る目的で、造血系細胞株K562細胞にGATA因子の転写活性を測定できるルシフェラーゼ(LUC)レポーター構築を導入した細胞株を樹立した。既存薬ライブラリーを用いてハイスループットスクリーニングを行った結果、ミトキサントロン(MTX)を含む17種の化合物を得た。さらに、マウス髄質内集合管細胞株(mIMCD)やヒト肺胞基底上皮腺癌細胞(A549)やマウス肺がん由来細胞株(3LL)を用いてEPO遺伝子誘導活性を検討した結果、ミトキサントロン(MTX)、および、その類縁化合物であるエピルビシンやダウノルビシンがEPO遺伝子誘導能をもち持っていること、その他の化合物は有意な誘導活性を持たないことが分かった。

2) 低酸素非依存的にEPO遺伝子誘導の確認

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。そこで、低酸素環境でのMTXのEPO遺伝子誘導活性を検討した。低酸素に晒されたヒト肝癌細胞株(Hep3B)において、EPO遺伝子やHIFの標的遺伝子であるGLUT1遺伝子の発現が誘導されることを確認した。一方、低酸素下でMTXを投与すると、むしろこれら遺伝子発現は減弱した。低酸素に晒されたmIMCDでは、グルコーストランスポーター1(Glut1)遺伝子の

発現は誘導されるが、*Epo* 遺伝子の発現は誘導されなかった。mIMCD 細胞に MTX を投与すると、低酸素暴露の有無にかかわらず *Epo* 遺伝子は誘導されたが、低酸素刺激で誘導された *Glut1* 遺伝子の発現は、MTX によりむしろ抑制された。以上の結果から、MTX による *EPO* 遺伝子誘導は低酸素応答機構とは無関係であることが示唆される。

3) 動物個体における異所性 *EPO* 遺伝子誘導

GATA 因子には GATA1 から GATA6 までの 6 つの分子が存在し、GATA1 から GATA3 は造血組織に主に発現しているため造血型 GATA 因子と呼称され、GATA4 から GATA6 は内胚葉特異的 GATA 因子とよばれている。腎臓、肺、心臓、肝臓における GATA 因子の発現プロファイルを検討したところ、心臓や肝臓では、予想通り GATA4 や GATA6 の発現が高かったが、腎臓では GATA2 と GATA3 が、肺では GATA2 と GATA3 と GATA6 が主に発現していた。このことから、これらの GATA 因子が、肺や腎臓で異所性の *EPO* 発現を抑制している可能性が考えられる。次に、MTX をマウスに投与し、MTX 投与してから 14 時間後および 20 時間後の肺上皮細胞および腎上皮細胞における *Epo* 遺伝子量を測定した。*Epo* 遺伝子の発現は、14 時間後では肺での発現が有意に高く、一方、20 時間後では腎臓での発現が高かった。ヘキソキナーゼ 1 (*Hk1*) 遺伝子や *Glut1* 遺伝子のような、HIF の標的遺伝子の発現には影響していなかった。これらの結果は、MTX が HIF とは異なった機構で腎臓や肺での *Epo* 遺伝子発現を制御していることを示している。

4) 上皮系細胞では異所性転写開始点を使って *EPO* 遺伝子が発現する。

GATA 結合配列は *EPO* 遺伝子のプロモーター領域の、通常は TATA ボックスが存在する場所に存在している。*EPO* 遺伝子を含むいくつかの遺伝子において、この GATA 結合配列が TATA ボックスの機能を代用して組織特異的な遺伝子発現に貢献しているという報告⁴⁾もあるので、この GATA 結合配列の機能障害が異常な転写を来す可能性が考えられた。そこで、*EPO* 遺伝子の転写開始点を明らかにすることとした。まず、通常の高酸素応答性の *EPO* 遺伝子転写開始点を、胎児肝臓(低酸素暴露した Hep3B 細胞)や腎 *EPO* 産生細胞(低酸素暴露したマウス腎組織)を用いて 5'-Rapid Amplification of cDNA End (RACE) 法で解析したところ、文献通り^{5,6)}、GATA 結合配列直下を転写開始点とする単一の転写産物が産生されていた。ところが、MTX を暴露した mIMCD 細胞や A549 細胞では、数 kbp から数十 kbp 上流の新規の転写開始点を使って転写され、異常なスプライシングを介して *EPO* 転写産物が産生されていることが分かった。

5) 異常な転写産物からの蛋白質産生の可能性の検討

MTX は上皮系細胞における *EPO* 遺伝子を数十倍程度の発現更新させることができるが、通常状態の上皮系細胞では *EPO* 遺伝子はほとんど発現していないため、上皮系細胞で産生される *EPO* 蛋白質を直接測定することはできなかった。そこで、実際に上皮細胞で産生される転写産物が蛋白質産生に寄与できるかを検討するために、mIMCD 細胞の *Epo* 遺伝子座に LUC をコードする遺伝子を挿入し、*Epo* 遺伝子発現制御下で産生される LUC の活性を測定できる細胞株を樹立した。この細胞に MTX を投与し、濃度依存的に LUC 活性が上昇することを確認した。以上の結果は、MTX などの GATA 因子阻害剤により、上皮系細胞から *EPO* 蛋白質を産生させることができる可能性を示すことができた。

4. 考察

本研究により、上皮細胞が、*EPO* 産生のポテンシャルを持つが、通常は GATA 因子により *EPO* 産生が抑えられていること、適切な GATA 阻害剤があれば、*EPO* 産生を休止している上皮系細胞から *EPO* 産生を促せることが示された。腎性貧血患者で障害を受けていない上皮系細胞からの異所性 *EPO* 産生誘導が、リコンビナント *EPO* 製剤補充療法に換わる治療戦略となり得ることを示している。

EPO の機能として、造血外効果の他に、組織保護作用⁷⁾があることが報告されている。また、カエルでは、貧血などの低酸素とは無関係に肺で *EPO* が産生されていることが分かっており⁸⁾、水生から陸生に変態するときに被る酸素暴露に対して肺保護に寄与している可能性が報告されている。上皮系細胞での *EPO* 遺伝子発現制御機構は、造血には余り影響を及ぼさない程度に適切に制御されており、局所での組織保護作用を得るために備わっている機構かもしれない。

本研究では、実際に *EPO* 蛋白質が上皮細胞で産生されることを直接は証明できなかった。また、*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* 蛋白質と腎臓で産生される *EPO* 蛋白質の機能的異同を明かにすることが、臨床的応用可能な治療薬創出のための大規模スクリーニングを開始する上で必要と考えている。

5. 発表論文

本研究の成果は以下の2報にまとめて報告した。

- Kaneko, H., Katoh, T., Hirano, I., Hasegawa, A., Tsujita, T., Yamamoto, M., and Shimizu, R. (2017). Induction of erythropoietin gene expression in epithelial cells by chemicals identified in GATA inhibitor screenings. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 22, 939-952.

- Yu, L., Moriguchi, T., Kaneko, H., Hayashi, M., Hasegawa, A., Nezu, M., Saya, H., Yamamoto, M., and Shimizu, R. (2017). Reducing Inflammatory Cytokine Production from Renal Collecting Duct Cells by Inhibiting GATA2 Ameliorates Acute Kidney Injury. *Molecular and cellular biology* 37, e00211–17.

6. 参考論文

1. Suzuki, N., Obara, N., Pan, X., Watanabe, M., Jishage, K., Minegishi, N., and Yamamoto, M. (2011). Specific contribution of the erythropoietin gene 3' enhancer to hepatic erythropoiesis after late embryonic stages. *Molecular and cellular biology* 31, 3896–3905.
2. Hirano, I., Suzuki, N., Yamazaki, S., Sekine, H., Minegishi, N., Shimizu, R., and Yamamoto, M. (2017). Renal Anemia Model Mouse Established by Transgenic Rescue with an Erythropoietin Gene Lacking Kidney-Specific Regulatory Elements. *Molecular and cellular biology* 37, e00451–16.
3. Obara, N., Suzuki, N., Kim, K., Nagasawa, T., Imagawa, S., and Yamamoto, M. (2008). Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood* 111, 5223–5232.
4. Aird, W.C., Parvin, J.D., Sharp, P.A., and Rosenberg, R.D. (1994). The interaction of GATA-binding proteins and basal transcription factors with GATA box-containing core promoters. A model of tissue-specific gene expression. *The Journal of biological chemistry* 269, 883–889.
5. Shoemaker, C.B., and Mitsock, L.D. (1986). Murine erythropoietin gene: cloning, expression, and human gene homology. *Molecular and cellular biology* 6, 849–858.
6. Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S.D., Kaufman, R.J., Mufson, A., Sehra, J., Jones, S.S., Hewick, R., Fritsch, E.F., et al. (1985). Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313, 806–810.
7. van Rijt, W.G., van Goor, H., Ploeg, R.J., and Leuvenink, H.G. (2014). Erythropoietin-mediated protection in kidney transplantation: nonerythropoietic EPO derivatives improve function without increasing risk of cardiovascular events. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 27, 241–248.
8. Nogawa-Kosaka, N., Hirose, T., Kosaka, N., Aizawa, Y., Nagasawa, K., Uehara, N., Miyazaki, H., Komatsu, N., and Kato, T. (2010). Structural and biological properties of erythropoietin in *Xenopus laevis*. *Experimental hematology* 38, 363–372.