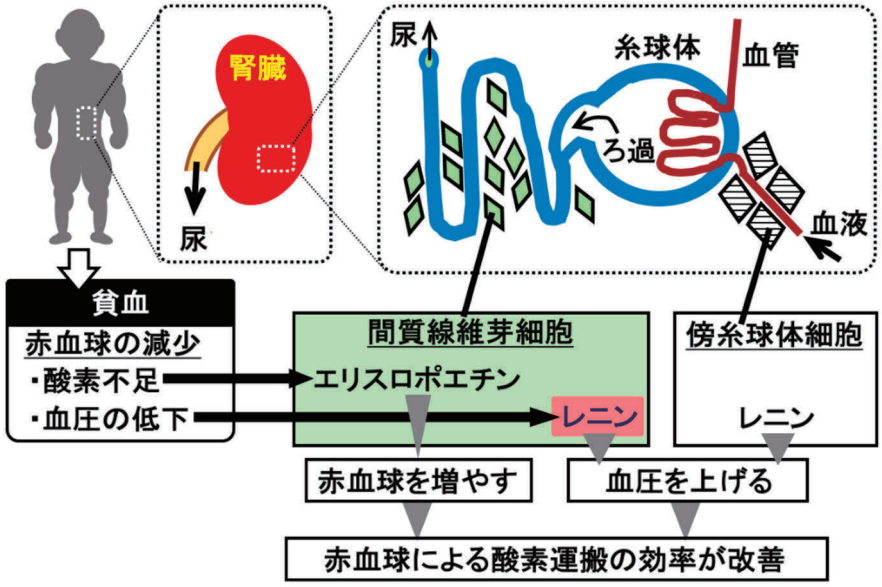
33　腎臓間質線維芽細胞による酸素供給恒常性の統合的制御	鈴木　教郎

【目的】腎臓の間質線維芽細胞は、赤血球増殖因子エリスロポエチンを低酸素誘導性に分泌することにより、酸素を運搬する赤血球の数を調節している。また、血圧を上昇させるレニンは、腎臓の傍糸球体細胞から分泌されることが知られていたが、研究代表者らは最近、血圧低下時に腎間質線維芽細胞でレニンの産生・分泌が誘導されることを発見した。以上の独自の知見は、腎間質線維芽細胞がエリスロポエチンやレニンを産生・分泌することにより、赤血球の分化増殖と循環を制御し、全身への酸素供給の恒常性を維持するうえで重要な役割を担うことを示唆している。そこで本研究では、これらの液性因子の腎間質線維芽細胞における産生制御様式を解明し、酸素供給維持機構に関する新知見を得ることを目的とした。

【方法】マウスの貧血モデル、腎障害モデルおよび低酸素曝露モデルを用いて、様々な負荷に対するレニン–アンジオテンシン系関連遺伝子の臓器別発現様式を RT-PCR 法より解析した。また、*in situ* hybridization 法により、エリスロポエチンおよびレニンの発現を組織レベルで調べた。ラットについても、同様の解析を実施した。さらに、腎臓病患者の腎生検組織切片の *in situ* hybridization を行い、ヒトにおける腎間質レニン産生について検討した。

【結果】貧血マウスの血圧を測定したところ、正常マウスよりも有意に低下していた。また、重篤な貧血時には、腎間質線維芽細胞から血圧を上昇させる作用のあるレニンが分泌されることをマウスおよびラットを用いた解析から確認した。そこで、貧血による低酸素と低血圧のいずれが腎間質線維芽細胞のレニン産生に影響を及ぼすかを検討したところ、低酸素ではなく、血圧低下であることが判明した。また、腎障害による腎線維化は腎間質のレニン産生を強く誘導し、マウスの全身血圧を上昇させることがわかった。以上の結果から、腎間質線維芽細胞は、エリスロポエチンとレニンを貧血誘導的に産生する能力を備えているが、その誘導機構は異なることが示された。

腎間質線維芽細胞による赤血球循環の制御



33. 腎臓間質線維芽細胞による酸素供給恒常性の統合的制御

鈴木　教郎

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

Key words：低酸素応答，血圧調節，赤血球造血，遺伝子改変マウス，線維化

緒　言

全身の臓器間質に分布する線維芽細胞は、各臓器の実質組織を物理的に支持することが主な役割として認識されており、間質線維芽細胞の研究は実質組織と比べて遅れている。しかし最近の研究から、臓器形成や疾患における間質線維芽細胞の重要性が明らかになりつつある。また、内分泌機能や微小環境の制御など、生体恒常性維持や臓器機能における線維芽細胞の役割も示されており、間質線維芽細胞は実質組織の隙間を埋めるだけという認識は改められつつある。われわれは、腎臓の間質線維芽細胞が赤血球増殖因子エリスロポエチン（EPO）を低酸素誘導性に分泌するメカニズムを明らかにしてきた［1〜3］。また、血圧を上昇させるレニンは、腎臓の傍糸球体細胞から分泌されることが知られていたが、最近、血圧低下時に腎間質線維芽細胞でレニンの産生・分泌が誘導されることを見出した［4］。これらの知見から、腎間質線維芽細胞が EPO およびレニンを産生・分泌することにより、酸素を運搬する赤血球の数と循環を制御し、全身への酸素供給を維持するうえで重要な役割を担うことが示唆された。そこで本研究では、これら液性因子の腎間質線維芽細胞における産生制御機構を解明し、酸素供給維持機構に関する新知見を得ることを試みた。また、各臓器の間質線維芽細胞が実質組織の物理的支持だけでなく、多彩な役割を担うことを提唱することを目標とした。

方　法

1. マウスおよびラットの解析

慢性貧血モデルには、遺伝子改変により EPO 欠乏性慢性貧血を呈するマウスを用いた［5］。また、野生型マウス（C57Blac/6 系統）に対して、フェニルヒドラジン投与による溶血または瀉血による貧血を誘導し、急性貧血モデルとした。低酸素シグナルの関与を調べるために、マウスに 6%酸素濃度の 48 時間曝露もしくは HIF 活性化剤（GSK360A）の投与を施した。血圧変化の影響を調べる際には、降圧剤（Losartan または Hydralazine）を投与し、全身血圧を tail cuff 法により測定した。さらに、重力変動の影響を調べるために、国際宇宙ステーション内で 1 ヶ月間飼育されたマウスを地上帰還後 2 日目に解析した［6］。Wister ラットに対してフェニルヒドラジン投与による溶血性貧血を誘導した。

2. 遺伝子発現解析

マウスおよびラットの腎臓から RNA を採取し、定量的 RT-PCR 法により遺伝子発現を解析した。*in situ* hybridization 法は RNA Scope（ACD 社）のプロトコルに従った。

3. ヒト腎生検

腎間質線維化を伴う慢性腎臓病患者 2 名の腎生検組織切片を OriGene 社から購入した。

結果および考察

1. 貧血による血圧低下と腎間質線維芽細胞におけるレニン産生誘導

慢性貧血マウス［5］を解析し、正常マウスと比べて有意に血圧が低下していることを確認した。この血圧低下は、マウスに EPO 製剤（C.E.R.A.）を投薬し、貧血を解消させると正常化した。貧血回復には EPO 投与から 1 週間以上の期間が必要であるが、血圧正常化にも 1 週間以上の経過と貧血回復が必要であった。この結果から、慢性貧血状態が血圧低下を招来することが確認された。また、EPO は赤血球を増やすことにより、貧血時の血圧を正常化する作用があり、直接的に血圧を上昇させる可能性は否定された。

貧血による血圧低下に対する生体応答機構を明らかにするために、EPO 欠乏性慢性貧血マウスにおける血圧調節系の遺伝子発現を解析した。その結果、主要な血圧調節系であるレニン-アンジオテンシン系に関連する遺伝子群のうち、腎臓のレニン mRNA 発現が慢性貧血マウスで正常マウスよりも亢進していることを確認した。また、EPO 欠乏性慢性貧血マウスにおける末梢血中のレニン濃度上昇も認めた。

貧血低血圧による腎レニン産生誘導を担う細胞を同定するために、*in situ* hybridization 法によるレニン mRNA 発現の組織切片上での検出を試みた。その結果、慢性貧血時には傍糸球体細胞に加えて尿細管間質線維芽細胞においてもレニン遺伝子が発現することを確認した［4］。また、レニン抗体を用いた免疫染色の結果からも、正常時のレニン産生は傍糸球体細胞に限定される一方で、貧血時には間質におけるレニン産生が誘導されることが確認された。

慢性貧血に加えて、急性期の貧血が血圧および腎間質レニン産生に及ぼす影響についても調べたところ、急性貧血によっても血圧低下と腎間質レニン産生誘導が観察された。急性貧血による血圧低下は、EPO 欠乏性慢性貧血マウスよりも重篤であり、検出限界以下であった。したがって、貧血は血圧を著しく低下させるが、血圧低下によって腎レニン産生が誘導されることにより、慢性期には徐々に血圧が是正されることが推察された。

2. 貧血による腎間質線維芽細胞のレニン産生誘導機序

二重 *in situ* hybridization 法により、急性貧血マウスにおける腎臓のレニンと EPO の遺伝子発現を同時に検出したところ、2 つの遺伝子は多くの間質線維芽細胞で同時に発現していることが示された。この結果から、腎間質線維芽細胞のなかには、貧血時に EPO とレニンを同時に分泌することにより、赤血球の数と循環速度を統合的に制御し、個体の酸素供給恒常性維持に貢献する細胞が存在すると考えられた。

貧血による尿細管間質線維芽細胞でのレニン産生誘導には、酸素供給低下と血圧低下が関与すると考え、マウスを用いた解析を進めた。まず、マウスを低酸素環境で飼育したところ、腎臓における EPO の発現増大は確認されたものの、レニン発現レベルは変化しなかった（図 1）。*EPO* 遺伝子は低酸素環境下で低酸素誘導性転写因子 HIF（hypoxia-inducible factors）を介して発現誘導されることが明らかになっているが［2］、HIF 活性化剤のマウスへの投与によっても腎 *EPO* 遺伝子発現は著増した［7～10］。一方、レニンの発現レベルは HIF 活性化剤の影響を受けなかった（図 1）。そこで、マウスに降圧薬（Hydralazine および Losartan）を投与し、血圧低下による腎レニン産生誘導への影響を調べた。その結果、貧血による尿細管間質線維芽細胞でのレニン産生誘導は、低酸素状態ではなく、血圧低下によって引き起こされることがわかった（図 1）。この結果は、高血圧モデルマウスでは腎レニン産生レベルが低下することからも実証された［4］。

重力変化は血圧を変動させることが知られているが、宇宙微小重力環境に 1 ヶ月滞在したマウスを地上帰還後に解析したところ、腎レニン遺伝子発現が亢進していた。ただし、重力変化によるレニン発現変化は傍糸球体細胞で生じており、腎間質のレニン産生は誘導されないことがわかった（図 2）［6］。以上の結果から、腎間質線維芽細胞のレニン産生は血圧低下によって誘導されており、低酸素や重力変化は直接的には影響しないことが明らかとなった。

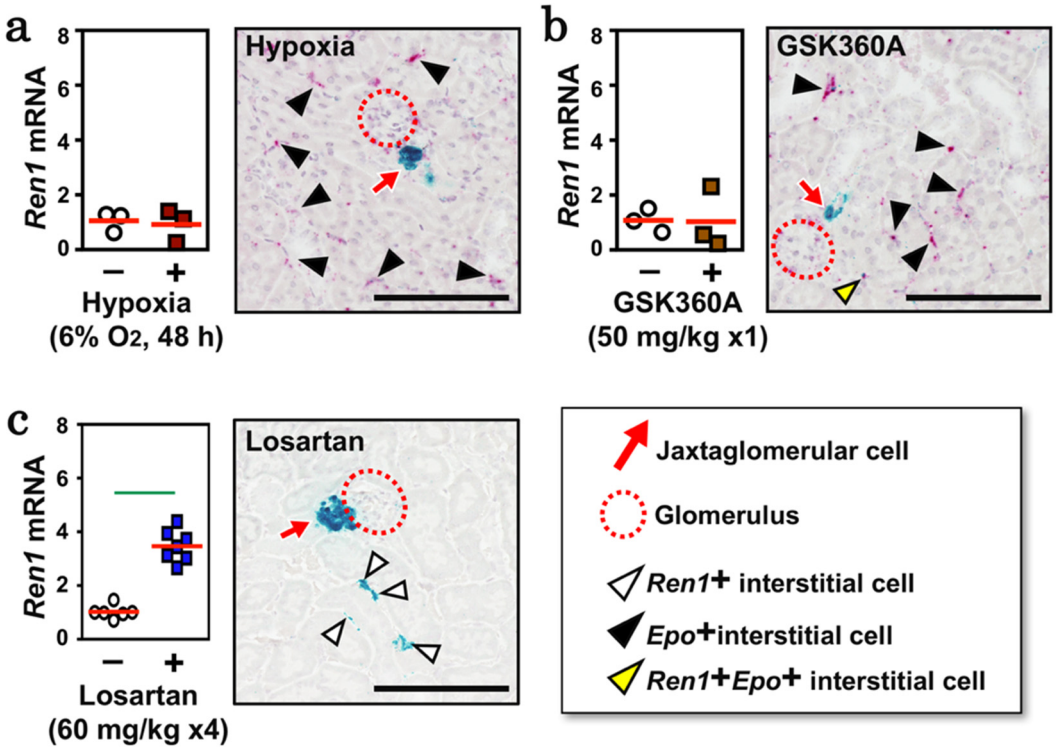


図 1. 低酸素シグナルおよび降圧剤が及ぼすマウス腎レニン発現への影響

野生型マウスに低酸素（Hypoxia）曝露（a）、HIF 活性化剤（GSK360A）投与（b）または降圧剤（Losartan）投与（c）を施し、腎臓におけるレニン mRNA 発現を RT-PCR 法（左）および *in situ* hybridization 法（右）により検出した。降圧剤でのみ有意な腎レニン発現誘導が観察された（P＝0.0002 by Student *t* test）。スケールバー：100 μm。

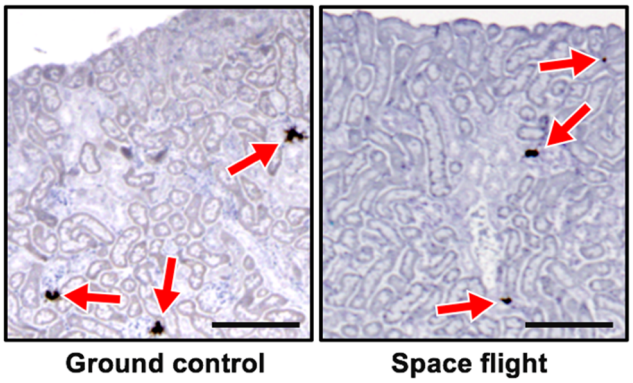


図 2. 宇宙微小重力によるマウス腎レニン発現への影響

野生型マウスを国際宇宙ステーションで 1 ヶ月間飼育し（Space flight, 右）、地上に帰還した後に腎レニン mRNA 発現を *in situ* hybridization 法により検出した（矢印）。*in situ* hybridization 法では、地上で飼育したマウス（Ground control, 左）と比較して、宇宙旅行による明確な変化を認めなかった。スケールバー：100 μm。

3. 腎間質レニン産生と病態との関連

腎臓病の慢性期には、間質線維芽細胞が筋線維芽細胞に形質転換し、腎臓が線維化する［1］。そこで、腎障害による腎間質線維芽細胞の変容がレニン産生と全身血圧に及ぼす影響について、マウス腎障害モデルを解析した。

その結果、筋線維芽細胞に形質転換した線維芽細胞の大部分において、レニン遺伝子発現が亢進していることを *in situ* hybridization 法により検出した。また、線維化による腎間質レニン発現の亢進レベルがマウスの全身血圧の上昇と相関することを見出した［4］。これらの結果は、慢性腎臓病が併発する腎性高血圧に腎間質レニン産生が関与していることを示している。そこで、腎間質線維化を呈する慢性腎臓病患者の腎生検を用いて、*in situ* hybridization 法によりレニン遺伝子発現細胞の検出を試みた。その結果、ヒトにおいても線維化した腎臓の筋線維芽細胞においてレニン発現が亢進していることがわかった。今後、腎臓病における尿細管間質線維芽細胞でのレニン産生様式を明らかにすることにより、慢性腎臓病や腎性高血圧などの病態解明につながることが期待される。

謝　辞

本研究は、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よって実施されました。また、東北大学医学系研究科の共通機器室および動物実験施設には大変お世話になりました。心からお礼申しあげます。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文　献

1） Suzuki N, Yamamoto M. Roles of renal erythropoietin-producing (REP) cells in the maintenance of systemic oxygen homeostasis. Pflugers Arch. 2016 Jan;468(1):3-12. PMID: 26054543 DOI: 10.1007/s00424-015-1740-2

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 Feb;27(2):428-38. Epub 2015 Jun 8. PMID: 26054543 DOI: 10.1681/ASN.2014121184

3） Yamazaki S, Hirano I, Kato K, Yamamoto M, Suzuki N. Defining the functionally sufficient regulatory region and liver-specific roles of the erythropoietin gene by transgene complementation. Life Sci. 2021 Mar 15;269:119075. Epub 2021 Jan 16. PMID: 33465391 DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119075

4） 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. 2021 Feb;64:103209. Epub 2021 Jan 25. PMID: 33508746 DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103209

5） 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. 2013;4:1950. PMID: 23727690 DOI: 10.1038/ncomms2950

6） Suzuki N, Iwamura Y, Nakai T, Kato K, Otsuki A, Uruno A, Saigusa D, Taguchi K, Suzuki M, Shimizu R, Yumoto A, Okada R, Shirakawa M, Shiba D, Takahashi S, Suzuki T, Yamamoto M. Gene expression changes related to bone mineralization, blood pressure and lipid metabolism in mouse kidneys after space travel. Kidney Int. 2022 Jan;101(1):92-105. Epub 2021 Nov 9. PMID: 34767829 DOI: 10.1016/j.kint.2021.09.031

7） 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. 2022 Mar;197:114939. PMID: 35114188 DOI: 10.1016/j.bcp.2022.114939

8) Sonoda K, Bogahawatta S, Katayama A, Ujike S, Kuroki S, Kitagawa N, Hirotsuru K, Suzuki N, Miyata T, Kawaguchi SI, Tsujita T. Prolyl hydroxylase domain protein inhibitor not harboring a 2-oxoglutarate scaffold protects against hypoxic stress. ACS Pharmacol Transl Sci. 2022 Apr 13;5(5):362-372. PMID: 35592438 DOI: 10.1021/acsptsci.2c00002

9) Sonoda K, Ujike S, Katayama A, Suzuki N, Kawaguchi SI, Tsujita T. Improving lipophilicity of 5-(1-acetyl-5-phenylpyrazolidin-3-ylidene)-1,3-dimethylbarbituric acid increases its efficacy to activate hypoxia-inducible factors. Bioorg Med Chem. 2022 Nov 1;73:117039. Epub 2022 Sep 29. PMID: 36198217 DOI: 10.1016/j.bmc.2022.117039

10) 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. 2023 Aug 8;7(15):3793-3805. PMID: 37146271 DOI: 10.1182/bloodadvances.2023009798.