

## エリスロポエチンによる赤血球造血の新規メカニズム解明

鈴木教郎

東北大学大学院医学系研究科 新医学領域創生分野

### 【研究の背景】

Epo は赤血球系細胞に発現する特異的受容体(EpoR)に結合し、赤血球分化増殖のシグナルを伝える。Epo は主に腎臓から分泌され、造血部位である骨髄で作用する。そのため、腎臓病では Epo 産生量が低下し、しばしば貧血(腎性貧血)を併発する。貧血治療において、遺伝子組換え Epo 製剤が用いられているが、しばしば効果が不十分な場合がある。Epo 低反応性の原因として、鉄利用や造血環境、造血細胞などにおける問題が指摘されているが、根本的な解決法は確立されていない。

我々は、Epo 産生機序の解明を目指した研究を進めており、その過程で、腎 Epo 産生能を欠損した遺伝子改変マウスの樹立に成功した(Yamazaki et al, Nature Commun 2013)。本マウスは、肝臓が Epo 産生を担う胎児期には異常を認めないものの、成獣で重篤な貧血を呈した。この「貧血マウス」の骨髄造血環境を解析したところ、Epo が骨髄におけるコラーゲン分解酵素 Mmp13 の遺伝子発現を誘導することを見いだした。コラーゲンは細胞外マトリクスの主成分であり、骨芽細胞が Mmp13 を分泌すると、骨髄中に細胞が増殖するためのスペースが形成されると考えられた。このことは、Epo が赤血球前駆細胞の分化増殖を誘導するだけでなく、骨髄環境のリモデリングを通して赤血球造血を誘導することを示唆している。

### 【目的】

Epo が赤血球前駆細胞の分化増殖を誘導するだけでなく、骨髄造血環境のリモデリングにも関与していると考え、その実態を解明する。また、貧血治療における Epo 反応性との関係から、Epo を介した骨髄造血環境リモデリングの意義を考察する。

### 【方法】

Epo 産生量が著しく低下した「貧血マウス」の骨髄造血環境を骨量に注目して解析する。また、貧血マウスに Epo 製剤を投与し、貧血から回復する過程の解析も行う。つぎに、骨髄環境リモデリングにおける Epo の標的細胞を明らかにするために、骨髄の細胞を分画し、EpoR の発現レベルを解析する。また、Epo に応答して赤血球系細胞で発現亢進する液性因子を同定するために、貧血マウスに Epo を投与した後の骨髄の赤血球系細胞を単離する。液性因子のなかには、RNA のスプライシング制御によって活性の異なるタンパク質を発現するものも存在するので、採取した赤血球前駆細胞について、RNA-シークエンス解析を行い、Epo による遺伝子発現様式の変化を網羅的に明らかにする。

### 【結果】

貧血マウスは全身性に低酸素状態に陥っており、心拡張などの貧血の合併症を呈していた。また、貧血マウスに様々な Epo 製剤を投与し、正常レベルの赤血球濃度に到達する条件を確定した(論文投稿中)。貧血マウスの骨量を MRI 法で測定したところ、野生型マウスに比べて有意に増大していた。Epo 製剤を用いて、1ヶ月間貧血を回復させたマウスの解析も行ったが、骨量が正常レベルに低下することはなかった。骨髄環境のリモデリングには数ヶ月以上の長い期間が必要となることが示唆された。

貧血マウスに Epo 製剤を投与し、6時間後の全骨髓細胞の遺伝子発現を解析したところ、*Mmp13* 遺伝子発現が有意に誘導されていた。*Mmp13* は主に骨芽細胞でつくられることから、マウス骨髓から単離した骨芽細胞の初代培養系に Epo 製剤を添加した。その結果、*Mmp13* 遺伝子発現の誘導は確認されなかった。この結果から、Epo による骨芽細胞での *Mmp13* 遺伝子発現誘導は、赤血球系細胞を介していることが示唆された。実際に、骨髓細胞分画のなかで、EpoR を高発現する細胞は赤血球系列の細胞に限局しており、赤芽球分画(CD71+/Ter119+)において非常に高いことがわかった。

貧血マウスに Epo を投与し、0、4、24 時間後の骨髓の赤芽球分画を単離し、遺伝子発現解析を行った。その結果、赤芽球の分化増殖に関わる遺伝子の発現が顕著に誘導されていたことに加え、鉄代謝系の遺伝子発現の亢進が認められた。現在、RNA-シークエンス法による網羅的解析を進めているところであり、骨芽細胞との関係に注目している。

## 【考 察】

Epo は骨髓の造血前駆細胞に作用し、赤血球造血促進のシグナルを伝えるが、骨髓は硬い骨に囲まれているため、造血スペースが限られている。そのため、急激な造血には、骨髓構造をリモデリングし、赤血球造血スペースを拡大する必要があると考えられる。骨芽細胞の初代培養系や、EpoR 発現解析から、Epo が直接的に骨芽細胞にシグナルを与える可能性は低い。Epo は赤芽球から液性因子の分泌を誘導し、骨芽細胞における *Mmp13* 産生誘導を介して骨髓環境をリモデリングすると考えられる。今後、骨髓における骨芽細胞、破骨細胞および赤血球前駆細胞の Epo 投与後の動態を二光子顕微鏡で観察する。また、Epo が赤血球前駆細胞を介して間接的に骨芽細胞を刺激することを示すために、赤血球系以外では EpoR を発現しないマウス(Suzuki et al, Blood 2002)にEpoを投与し、Epo による骨髓リモデリングが観察されることを確認する必要がある。また、骨芽細胞での *Mmp13* 産生を誘導する赤芽球由来の液性因子を同定し、Epo による骨髓造血環境リモデリングの分子機序を解明する。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

遺伝子組換え Epo 製剤は、すでに貧血治療に効果を発揮している。本研究の成果は、Epo の新たな作用を明らかにするとともに、貧血の分子病態への理解を進め、加齢や疾病に伴う骨髓造血スペース萎縮に対する治療法開発にも繋がることが期待される。

## 【参考・引用文献】

- 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. *Nature Commun.* 4: e1950 (2013)
- 鈴木教郎. 赤血球造血制御による個体レベルの酸素恒常性維持機構. *実験医学* 33, 1724–1730 (2015)
- Suzuki N, Yamamoto M. Roles of renal erythropoietin-producing (REP) cells in the maintenance of systemic oxygen homeostasis. *Pflugers Arch.* 468: 3-12 (2016)
- 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: 428-438 (2016)