

HIF-PH 阻害薬による鉄代謝制御を介した貧血治療効果の分子機序

鈴木教郎

東北大学 未来科学技術共同研究センター

【研究の背景】

慢性腎臓病は成人の約 5 人に 1 人が罹患する進行性の疾病であり、赤血球造血因子エリスロポエチン(EPO)の産生能低下による貧血(腎性貧血)を頻繁に併発する。腎性貧血治療には、遺伝子組換え EPO 製剤が用いられてきたが、注射による侵襲性や EPO 製剤不応性の問題が存在していた。これらの課題を解決する新規治療薬として、低酸素誘導性転写因子 HIF (hypoxia-inducible factors) の水酸化酵素 (HIF- prolyl hydroxylase [HIF-PH] または prolyl hydroxylase domain protein [PHD]) を阻害し、内在性の EPO 産生を誘導する薬剤が 2019 年から使用されている。一方、鉄代謝に関わる遺伝子群が HIF によって制御されるため、HIF-PH 阻害剤は EPO 産生誘導に加えて、ヘモグロビン合成への鉄利用促進を介して貧血治療効果を発揮すると考えられている。しかし、HIF-PH 阻害剤による鉄代謝改善の分子機序は不明である。また、現在上市されている 5 剤の HIF-PH 阻害剤の薬剤横断的な研究やそれぞれの薬力学的な検証は不十分であり、各薬剤の患者個別の使用基準は確立されていない。

これまでに我々は、EPO の低酸素誘導的産生制御機構の解明に挑み、腎尿細管間質に分布する EPO 産生性の線維芽細胞(REP 細胞)では、PHD (HIF-PH) のアイソフォームのうち PHD2 が低酸素を感知し、HIF のアイソフォームのうち HIF2 α を介して EPO 遺伝子に伝えることを示した (*Nat Commun* 2013)。また、炎症シグナルが REP 細胞の HIF2 α を恒常的に不活性化することが、腎臓病で貧血が併発する原因であることを特定した (*J Am Soc Nephrol* 2013, 2016; *Sci Rep* 2019)。そこで、HIF-PH 阻害薬による貧血治療効果の分子機序解析を進め、HIF-PH 阻害薬が REP 細胞特異的に EPO 産生を誘導することを確認した (*Kidney Int* 2018; *EBioMedicine* 2021)。また、HIF-PH 阻害薬のマウス体内動態を組織レベルで解析し、腎臓病では薬剤の組織移行性が低下することを見だし、エステル化修飾による組織移行性の改良に成功した (*Biochem Pharmacol* 2022)。

【目 的】

HIF-PH 阻害薬が EPO 産生誘導に加えて食餌鉄および貯蔵鉄の利用を促進することにより、統合的に赤血球造血を誘導する機序を示す。本研究の成果は、HIF による造血制御機構の理解を深め、輸血後鉄過剰や鉄代謝異常に対する HIF-PH 阻害薬の適用拡大につながる。

【方 法】

腎性貧血のモデルとして、腎 EPO 産生能を欠損した遺伝子改変マウス(EPO 欠乏性貧血マウス)を用いた。このマウスは、ヘモグロビン合成における鉄利用が低下しているため、血清鉄および組織鉄が増加した相対的鉄過剰状態を示す (*Nat Commun* 2013; *Haematologica* 2016)。EPO 製剤 (C.E.R.A.) および各種 HIF-PH 阻害薬 (Daprodustat、Enarodustat、Molidustat、Vadadustat および Roxadustat) による鉄代謝系への作用の相違を究明するために、EPO 欠乏性貧血マウスおよび野生型マウスに各種薬剤を単回投与した (*Kidney Int* 2018; *EBioMedicine* 2021)。投薬から 6 時間および 24 時間後に、末梢血、腎臓、肝臓、脾臓、十二指腸を採取し、血清鉄濃度測定、ベルリンブルー組織染色、遺伝子発現解析を実施した。また、肝臓特異的に HIF2 α を発現するトランスジェニックマウスを作成し、肝実質細胞における HIF2 α の活性化が鉄代謝と

赤血球造血に及ぼす影響を解析した。この HIF2 α は、PHD の標的となるプロリン残基をアラニン残基に置換しているため、PHD による水酸化修飾を受けず、HIF-PH 阻害薬が肝臓で恒常的に作用している状態を模倣している (*Mol Cell Biol* 2025)。さらに、東北メディカル・メガバンク機構で整備している地域住民コホートデータを用いて鉄代謝に関連した GWAS (genome-wide association study) を実施し、2,095 人分の血清における鉄、フェリチンおよびトランスフェリンの濃度に影響する遺伝子多型を探索した。得られた結果から、HIF 活性化および EPO 投与が健常時のヒト鉄代謝に及ぼす影響を考察した。

【結 果】

5 種類の現行 HIF-PH 阻害薬を各々 50 mg/kg の容量で健常マウスに投与したところ、投薬から 6 時間後までに腎臓および肝臓の *Epo* 遺伝子発現レベルが亢進した。各臓器の *Epo* mRNA 誘導レベルは薬剤によって異なったが、腎臓の *Epo* mRNA レベルと血中 EPO 濃度が正相関した (*Blood Adv* 2023; *Life Sci* 2024)。この結果から、HIF-PH 阻害薬は腎 EPO 産生誘導を介して造血促進効果を発揮すると考えられた。実際に、腎 EPO 産生能を欠損した EPO 欠乏性貧血マウスでは、野生型マウスと比べて、HIF-PH 阻害薬による血中 EPO 濃度の上昇は軽微であり、連日投与による赤血球数の増加も認められなかった。一方、遺伝学的に肝実質細胞で HIF2 α を恒常活性化すると、血中 EPO 濃度が著しく亢進し、末梢赤血球数が増加した (*Mol Cell Biol* 2015, 2025)。したがって、赤血球造血を誘導するレベルの EPO 産生を肝臓で誘導するには、肝臓の PHD を慢性的に強く抑制する必要があると考えられた。しかし、肝 HIF2 α 恒常活性マウスは重篤な脂肪肝を呈して衰弱したことから、肝臓の EPO 産生を誘導する HIF-PH 阻害薬の開発・利用には注意が必要であることがわかった。

次に、現行 HIF-PH 阻害薬のうち、Enarodustat、Vadadustat および Roxadustat において、投与 6 時間後に十二指腸における *Cybrd1* および *Slc11a2* 遺伝子の発現が増大することを確認した。*Cybrd1* および *Slc11a2* 遺伝子は、十二指腸での食餌からの鉄吸収に必要な DCYTB および DMT1 をコードしており、HIF によって転写誘導されることが知られていることから、HIF-PH 阻害薬が食餌鉄の吸収効率を向上させる可能性が示された。両遺伝子の発現レベルはマウス血中 EPO 濃度と相関せず、十二指腸での HIF 標的遺伝子群 (*Egln3* など) の発現レベルと相関したため、HIF-PH 阻害薬による鉄吸収遺伝子の発現誘導は EPO 産生誘導を介した間接的な作用ではなく、薬剤の直接的な影響であると考えられた。また、これらの遺伝子発現誘導は EPO 製剤投与や EPO 欠乏性貧血マウスへの HIF-PH 阻害薬では認められなかったことから、HIF-PH 阻害薬は十二指腸で直接的に HIF を活性化し、鉄吸収遺伝子発現を誘導することがわかった。

ベルリンブルー染色により、野生型マウスの脾臓では貯蔵鉄が検出されたが、HIF-PH 阻害薬の投与によって速やかに消失した。EPO 欠乏性貧血マウスでは、相対的鉄過剰状態となっているため、脾臓や血清中の鉄濃度が亢進しているが、脾臓の鉄沈着は EPO 製剤によって完全に消失した。しかし、HIF-PH 阻害薬は貯蔵鉄の減少効果を示さなかった (*Haematologica* 2016; *Blood Adv* 2023)。一方、HIF-PH 阻害薬と C.E.R.A. は同程度の血清鉄低下効果を示した。そこで、貯蔵鉄の放出を抑制するヘプシジンについて解析したところ、血中 EPO 濃度が低いと肝ヘプシジン産生を抑制できないことがわかった。また、ヘプシジン抑制因子エリスロフェロンの赤芽球における産生量が血中 EPO 濃度と正相関した。以上の結果から、鉄貯蔵細胞からの鉄放出には、腎臓からの EPO 分泌が必要であることが明らかとなった。また、血液中の鉄利用促進には、肝臓からの少量の EPO 産生による微弱な赤血球造血誘導で十分であることがわかった。さらに、HIF-PH 阻害薬によって誘導された EPO は、赤芽球からのエリスロフェロン分泌を誘導し、肝ヘプシジン抑制を介して貯蔵鉄をヘモグロビン合成に利用する経路が示された。十二指腸の鉄吸収細胞から血管内への鉄放出もヘプシジンによって制限されることから、食餌鉄のヘモグロビン合成への利用促進にも EPO を介したヘプシジン抑制が関与すると考えられた。

鉄代謝に関連した GWAS の結果、ヘプシジンの発現抑制に関与する遺伝子 *TMPRSS6* のミスセンス多型が血清鉄濃度の上昇と関連することがわかった。また、血管内皮細胞増殖因子 VEGFA およびトランスフェリン受容体 TFR2 の遺伝子発現制御領域にも血清鉄濃度と関連する多型を見つけた。*VEGFA* 遺伝子は HIF 標的遺伝子であることから、HIF-PH 阻害薬が *VEGFA* レベルを変化させ、鉄代謝に影響する可能性が示唆された。また、TFR2 は肝実質細胞で血液中の鉄濃度を感知してヘプシジンの遺伝子発現を誘導するが、同定された多型のマイナーアレルは肝臓での *TFR2* 遺伝子発現レベルを低下させることがわかった。さらに、*TFR2* 遺伝子は *EPO* 遺伝子と 7 番染色体上で隣接しているが、今回同定した多型は血中 EPO 濃度の増加と関連する *EPO* 遺伝子発現制御領域内の多型と同一の連鎖不平衡ブロックに含まれていた。*TFR2* と *EPO* のマイナーアレルを重複して保有する個人は、ヘモグロビン濃度の低い赤血球の造血が亢進していた。本 GWAS の結果から、健常なヒトにおいても鉄代謝と赤血球造血が相互に連係しており、連係の一部に HIF が関与することが理解された。

【考察・臨床的意義・臨床への貢献度】

マウスを用いた解析により、HIF-PH 阻害薬の体内動態と HIF 標的遺伝子発現誘導における薬剤特異性を明らかにした。本研究の薬物動態に関するデータは、臨床試験や実臨床データと概ね一致していたことから (*Mol Cell Biol* 2025)、マウスを用いて得た知見をヒトに適用できると考えられた。また、HIF-PH 阻害薬は肝臓ではなく腎臓の EPO 産生を誘導することによって貧血治療効果を示すことが明らかとなった。この結果は、腎臓を摘出した患者では、HIF-PH 阻害薬の薬効が減少するという報告と一致する。腎性貧血では腎機能が障害されているため、HIF-PH 阻害薬に応答した EPO 産生レベルは病態進行とともに低下するが、腎機能の保全が HIF-PH 阻害薬による貧血治療において重要であることが示唆された。

HIF-PH 阻害薬が食餌鉄の吸収を促進することを示したが、この作用は EPO 製剤では認められないことから、鉄吸収促進は HIF-PH 阻害薬に特異的な造血誘導効果であることがわかった。一方、HIF-PH 阻害薬によるヘプシジン産生抑制は EPO 産生誘導とエリスロフェロン産生誘導を介した間接的な効果であった。HIF-PH 阻害薬による鉄利用促進効果は実臨床等から示唆されていたが、本研究により、その分子機序の一端が明らかとなり、EPO 製剤に対する HIF-PH 阻害薬の優位性を示すことができた。GWAS 解析からは、鉄欠乏や EPO 産生不全などの病態下だけでなく、健常人においても鉄代謝と赤血球造血が HIF を介して相互に関連していることが示唆された。

【参考・引用文献】

1. 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, 32-45, 2025a
2. Suzuki N, Nakai T, Iwamura Y, Kato K. Hypoxia signaling in the cell type-specific regulation of erythropoietin production throughout mammalian development. *Mol Cell Biol* 45, 386-394, 2025b (先進医薬研究振興財団への謝辞あり)
3. 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, 179-184, 2024
4. Nakai T, Saigusa D, Kato K, Fukuuchi T, Koshiba S, Yamamoto M, Suzuki N. The drug-specific properties of hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase inhibitors in mice reveal a significant contribution of the kidney compared to the liver to erythropoietin induction. *Life Sci* 346, 122641, 2024
5. 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, 3793-3805, 2023
6. 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
7. 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* 269, 119075, 2021 (先進医薬研究振興財団への謝辞あり)
8. 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
9. 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 HIF2 α concentrations in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int* 94: 900-911, 2018
10. Suzuki N, Sasaki Y, Kato K, Yamazaki S, Kurasawa M, Yorozu K, Shimonaka Y, Yamamoto M. Efficacy estimation of erythropoiesis-stimulating agents using erythropoietin-deficiency anemic mice. *Haematologica* 101, 356-360, 2016 (先進医薬研究振興財団への謝辞あり)

11. 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
12. 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