

博士論文（要約）

PHD inhibitor protects proximal tubular cells in ischemia model

*in vitro* via upregulation of glycogen storage

（PHD 阻害薬はグリコーゲン貯蔵増加により *in vitro* 虚血

モデルにおいて近位尿細管細胞を保護する）

伊藤 麻里江

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 PHD inhibitor protects proximal tubular cells in ischemia model *in vitro* via upregulation of glycogen storage

(PHD 阻害薬はグリコーゲン貯蔵増加により *in vitro* 虚血モデルにおいて近位尿細管細胞を保護する)

氏名 伊藤 麻里江

急性腎障害 (AKI) は特に入院患者に高頻度に合併し死亡率も高いことから臨床的意義が大きいが、AKI の予防・治療の進歩は小さい。虚血再灌流障害 (IRI) は AKI の主要な原因であり、移植や大手術、心不全に合併しやすい。

尿細管は IRI の重要な標的部位で、還流低下や低酸素に脆弱である。近年、hypoxia-inducible factor (HIF) が低酸素への適応反応を総合的に調節する因子として注目されている。HIF は HIF1 $\alpha$  または 2 $\alpha$  と、恒常的に発現している HIF $\beta$  で構成される。HIF $\alpha$  は常に発現する一方で通常酸素濃度下では分解され続け、この分解は prolyl hydroxylase domain-containing enzymes (PHD) によって主に調節されている。PHD には 1-3 の isoform があり、尿細管では PHD2 が主に HIF 分解を担う。PHD は酸素を水酸化反応に用いるため酸素濃度が低下すると PHD が不活性化される。低酸素では PHD の不活化により HIF $\alpha$  が蓄積し、核に移行して HIF $\beta$  とヘテロ二量体を形成し hypoxia response element (HRE) に結合する。このように HIF は幅広い低酸素反応に関わる遺伝子発現を調整する。

PHD 阻害薬は腎性貧血治療薬として治験段階にあり、enarodustat はこうした PHD 阻害薬のひとつである。腎性貧血の治療以外に、HIF 活性化による傷害に対する臓器保護効果が期待される一方、線維化促進の可能性も示唆されており、腎臓病予防・治療における HIF の役割は不明瞭である。

oxygen-glucose deprivation (OGD) や虚血のようなグルコースと酸化的リン酸化が抑制された状態では、グリコーゲンは重要な ATP 産生源となる。hypoxic preconditioning を行うと、グリコーゲン産生経路を活性化しグリコーゲン蓄積が増えることで悪性細胞の OGD による傷害は低減される。筋細胞や骨膜細胞でも同様のグリコーゲン蓄積効果が示されている。腎臓でのグリコーゲン蓄積は肝臓に比べてかなり少なく、肝臓のグリコーゲンに血糖を保持する働きがあるのに比べて腎臓ではこの働きはほとんどない。しかし、虚血下のような重度のエネルギー欠乏状態で、細胞そのもののエネルギー産生に使用される可能性は調べられていない。

本研究では、細胞の腎虚血モデルにおいて PHD 阻害薬とグリコーゲン貯蔵の細胞保護効果を調査し、PHD 阻害による AKI 予防の可能性を探索する。

まず、近位尿細管細胞の HK2 とプライマリー細胞である RPTEC を、グルコースなしの培地に交換し 0.1% 酸素下におく OGD に暴露した。PHD 阻害剤の効果を調べるために、細胞を

DMSO または enarodustat を 24 時間事前投与した。解析は Muse cell analyzer (Merck Millipore, USA) により行った。enarodustat 投与群では DMSO 投与群に比して 16 時間の OGD 後の生存細胞数が増加し、アポトーシスの割合は減少した。RPTEC では enarodustat による細胞数保持効果はわずかだが見られた。どちらの細胞でも活性酸素陽性細胞は enarodustat 投与により有意に減少した。HK2 に対し siRNA により PHD1、2、3 をノックダウンしたところ、PHD2 ノックダウンで enarodustat と同様の結果を得た。PHD2 が HIF を主に調節していることから、HIF が細胞保護効果を媒介していると考えた。HIF1 $\alpha$  と HIF2 $\alpha$  を siRNA によりノックダウンしたところ、HIF1 が主にこの効果を媒介していた。

次に、HK2 で DMSO または enarodustat を 24 時間投与後にグリコーゲン合成に関わる遺伝子を qPCR によって測定した。Phosphoglucomutase (PGM1)、UDP-glucose pyrophosphorylase (UGP2)、glycogen synthetase (GYS1)、branching enzyme (GBE1) がこれらに含まれる。UGP2 以外の mRNA が enarodustat 投与群で増加し、HIF1 ノックダウンによりこの増加は相殺された。この結果、enarodustat 投与群でグリコーゲン蓄積が増加し、5 時間の OGD 後もこの増加は保持された。同様のグリコーゲン蓄積増加を RPTEC でもみとめた。グルコースと同様にグリコーゲンは glucose-6-phosphate を産生し、pentose phosphate pathway (PPP) の基質となる。PPP では NADPH が産生され、還元 glutathione (GSH) を生成する。GSH は過酸化水素が glutathione peroxidase (GPX) により還元される反応で消費される。enarodustat 投与により NADP/NADPH 比や GSSG/GSH 比は減少した。

Flux analyzer は解糖と酸化的リン酸化の速度を生細胞で測定できる。しかし、0.1%酸素下においた状態でこの解析を施行できないため、無酸素と同様に酸化的リン酸化を阻害する方法として HK2 に rotenone と antimycin A を投与した。このモデルでは OGD と同様に enarodustat による細胞保護効果を示すことを確認し、解糖速度を測定した。酸化的リン酸化が完全に阻害されているため、解糖速度はすなわち ATP 産生速度と解釈できる。enarodustat 投与群で解糖速度または ATP 産生速度の減少は DMSO 投与群よりも緩徐で、グリコーゲン蓄積増加と矛盾しなかった。

オートファジーは大分子や傷害された細胞小器官を分解し再利用する経路であり、飢餓で栄養を産生したり、活性酸素を減少させるメカニズムである。いくつかの既報で HIF がオートファジーを活性化することが示されているが、低酸素によるオートファジーの調節は細胞種や実験条件によって異なる。オートファジーが PHD 阻害による細胞保護効果に寄与するか調べるために、CRISPER-Cas9 を用いて Atg5 ノックアウト細胞を作成した。Atg5 ノックアウト細胞でも enarodustat による細胞保護に変化はなく、本実験系ではオートファジーの寄与はないと結論づけた。

一方、グリコーゲンの役割を調べるために、グリコーゲン分解を 2-Deoxy-D-glucose (2-DG) を用いて阻害した。2-DG は enarodustat の細胞保護効果を相殺した。また、グリコーゲン合成の律速酵素である GYS1 を siRNA によりノックダウンしたところ、同様に enarodustat の細胞保護効果を相殺した。

また、NADPH と GSH の酸化還元反応を媒介する glutathione reductase (GR)を阻害する 2-AAPA を使用してグリコーゲン由来の GSH の役割を調べた。2-AAPA も enarodustat の細胞保護効果を相殺した。ROS 減少だけでなく細胞数保持も相殺したことから、ATP 欠乏だけでなく活性酸素の増加も細胞死に寄与することが示唆された。

HIF による Ischemic/hypoxic preconditioning のメカニズムは下記のものと考えられている。エリスロポエチンのような単一の遺伝子でもこの保護効果を示すが、いくつかの保護的な経路を活性化させるために多数の標的遺伝子が合同で作用して相乗効果をもたらしている。例えば、表皮の HIF2 は vascular cell adhesion molecule 1(VCAM1)を介して IRI 関連の炎症と線維化を抑制する。HIF2 はまたいくつかの抗酸化遺伝子発現を増加させることで保護効果をもたらす。HIF1 も同様にもうひとつの抗酸化遺伝子である heme oxygenase 1(HMOX1)の転写を調節する。アデノシンや NO シグナルも抗アポトーシス経路に関わっている。代謝改編は低酸素への耐性を得るための重要な経路である。

本研究から、我々はグリコーゲン貯蔵が腎虚血傷害に対して、PHD 阻害が保護効果をきたすメカニズムであると提唱する。グリコーゲン合成に関連する遺伝子の発現増加により、HIF1 はグリコーゲン貯蔵を増やす。グリコーゲンは解糖系で ATP を産生すると共に、PPP より抗酸化物質を産生する。

オートファジーは HIF による低酸素への適応反応のひとつである。しかし、本実験系ではオートファジーは enarodustat の保護効果に寄与しなかった。これは、オートファジーにより産生される栄養素がアミノ酸であり、重度の酸素欠乏では ATP 産生ができないことに起因するのかもしれない。

本研究は細胞実験であり、どの程度生体に応用できるかは探索していない。他臓器の IRI におけるグリコーゲンの働きは調べられており、心臓や脳では解糖系の促進は乳酸の蓄積やアシドーシスによりむしろ有害に働くという報告がある。しかし、腎での報告はなくさらなる研究が俟たれる。腎は乳酸代謝が活発である点で上記の臓器と異なっており、乳酸貯蔵の効果を相殺する可能性がある。

enarodustat を含む PHD 阻害薬は腎性貧血に対し近い将来臨床使用されると考えられる。本研究は PHD 阻害薬が AKI 予防に使用できる可能性を示唆する。

PHD 阻害薬は PGM1、GYS1、GB1 といったグリコーゲン合成に関わる遺伝子転写を HIF1 を介して増加させることでグリコーゲン貯蔵を増やす。in vitro 虚血モデルではグリコーゲンは唯一の ATP 産生源となる。グリコーゲンは PPP により NADPH を産生し、GSSG を GSH へ還元して活性酸素を減少させる。結果として、虚血モデルで PHD 阻害は尿細管細胞を保護する。