

【各 論】

HIF-PH 阻害薬と ESA の相違点 HIF-PH 阻害薬による赤血球造血誘導と 鉄利用促進の分子機構*

中井 琢** 鈴木教郎***

はじめに

赤血球造血因子エリスロポエチン (EPO) は、腎臓尿細管間質に存在する線維芽細胞 [renal EPO producing (REP) 細胞] から低酸素誘導的に産生される。腎障害が生じると、REP 細胞の低酸素応答系が破綻し、腎 EPO 産生能が失われる。その結果、EPO 欠乏性の貧血 (腎性貧血) が発症する。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、2019 年から低酸素応答系を活性化する薬剤 [hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase (HIF-PH) 阻害薬] が使用されはじめた。HIF-PH 阻害薬は、EPO 遺伝子のみならず多くの低酸素誘導性遺伝子の転写を活性化するため、副作用の懸念とともに副次的な効果も期待されている。特に、低酸素誘導性遺伝子群は鉄代謝に関連する遺伝子を多く含むことから、鉄利用障害に起因する EPO 製剤抵抗性の貧血に対しても、HIF-PH 阻害薬は EPO 産生と鉄利用の双方を促進することによって優れた貧血改善効果を示すと期待されている。

本稿では、赤血球造血系と鉄代謝制御系の相互関連機構を概説するとともに、HIF-PH 阻害薬による多面的な貧血治療効果の可能性について紹介する。

1 腎 EPO 産生制御機構

EPO は赤血球の分化・成熟に必須の液性因子であり、成体では REP 細胞が EPO 産生の大部分を担う¹⁾。一方、個体発生過程においては神経堤細胞の一部が最初に EPO を産生し²⁾、その後、EPO 産生部位は肝実質細胞へと移る。肝臓は成体においても EPO 産生能を保持しているが、肝臓から産生される EPO の総量は腎臓と比べると少なく、腎障害による腎 EPO 産生低下を補うことはできないため、腎性貧血が発症する^{1,3)}。

腎臓における EPO 分泌の律速段階は EPO 遺伝子の転写段階であり、HIF と prolyl hydroxylase domain-containing protein (PHD) による低酸素応答系によって制御されている (別稿参照)。HIF と PHD にはそれぞれ 3 つのアイソフォームがあるが、REP 細胞における EPO 遺伝子の発現は主に HIF2 α -PHD2 経路によって制御されている (図)。一方、肝実質細胞でも HIF2 α が EPO 遺伝子の転写を活性化するが、PHD は 3 つのアイソフォームが代償的に機能する^{4,5)}。HIF2 α が作用する EPO 遺伝子のエンハンサー配列も腎臓と肝臓で異なっており、腎臓では EPO 遺伝子上流側に、肝臓では転写終結点の下流に存在することがわかっている⁶⁾。

* Effects of HIF-PH inhibitors on erythropoiesis and iron metabolism

key words : エリスロポエチン, REP 細胞, ヘプシジン, エリスロフェロン, HIF2 α

** 東北大学大学院医学系研究科 酸素医学分野 NAKAI Taku, SUZUKI Norio

*** 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

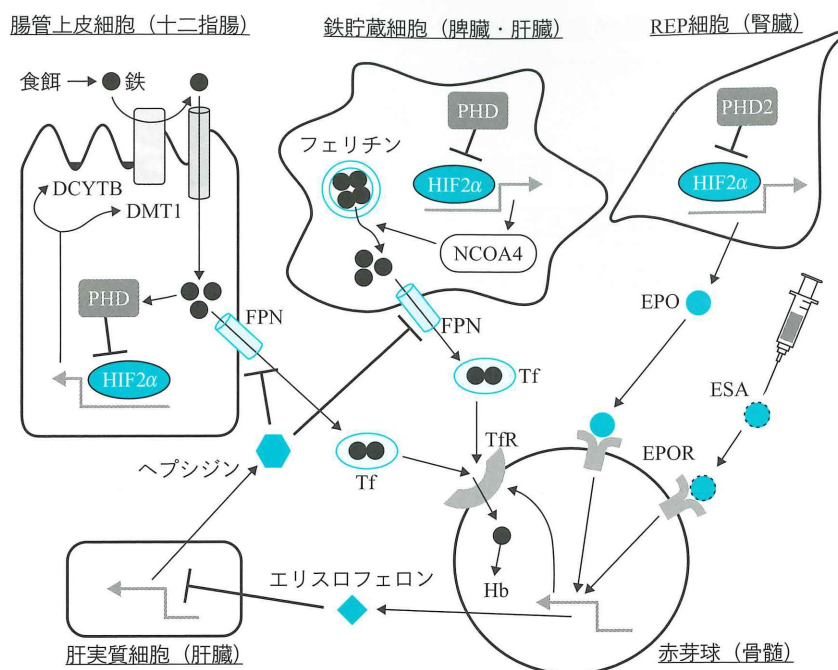


図 多臓器が関与する赤血球造血系と鉄代謝系の運動制御

REP 細胞から産生された EPO または外来の ESA は、骨髄の赤芽球に発現する EPO 受容体 (EPOR) に結合する。その結果、トランスフェリン受容体 (TfR) やエリスロフェロンの遺伝子の転写が誘導される。赤芽球で産生されたエリスロフェロンは、肝臓におけるヘプシジン遺伝子の発現を抑制する。ヘプシジン産生が抑制されると、腸管上皮細胞や鉄貯蔵細胞などからのフェロポーチン (FPN) を介した鉄放出が促進される。細胞外に放出された鉄は血液中でトランスフェリン (Tf) となり、TfR を介して赤芽球に取り込まれた後、ヘモグロビン (Hb) 合成に利用される。EPO シグナルに加えて、低酸素応答系も鉄代謝に深くかかわっており、REP 細胞の *EPO* 遺伝子に加え、腸管上皮細胞で食物中の鉄の吸収に必要な DCYTB と DMT1、鉄貯蔵細胞でフェリチンからの鉄放出に必要な NCOA4 などの遺伝子の発現を HIF2 α が誘導する。また、PHD による HIF2 α の抑制には鉄が必要である。

II 腎障害による EPO 産生能喪失機序

腎臓が障害を受けると、REP 細胞は筋線維芽細胞に形質転換して線維化を引き起こすと同時に EPO 産生能を喪失して貧血の原因となる。EPO 産生能喪失の分子機序は形質転換の進行に伴って変化することがわかっており、形質転換の初期段階では PHD の活性が異常に亢進し、HIF が恒常的に分解されるために EPO 産生が誘導されなくなる⁴⁾。形質転換がさらに進行した細胞では、EPO と HIF2 α の遺伝子領域が DNA メチル化されており、PHD の活性にかかわらず *EPO* 遺伝子発現は恒常的に不活化されている⁷⁾。したがって、

HIF-PH 阻害薬は、形質転換初期段階の筋線維芽細胞では異常活性化した PHD を阻害することによって EPO 産生を誘導することができるが、形質転換が進行した筋線維芽細胞では PHD を阻害しても活性化する HIF2 α が不十分であり、EPO 産生誘導効果を期待できない。しかし、末期腎不全患者においても HIF-PH 阻害薬が有効であったケースが確認されている。この機序については、線維化が進行した腎臓においても形質転換初期段階の筋線維芽細胞が残存しており、これらの細胞に HIF-PH 阻害薬が作用することにより EPO 産生を誘導できることが、マウスやラットを用いた解析から示されている^{8,9)}。

III 赤血球造血と鉄代謝制御の連携

赤血球は、ヘモグロビンに内包される鉄に酸素を配位することにより、全身の臓器に酸素を運搬する。赤血球の寿命は約120日程度と短く、古くなった赤血球は脾臓などのマクロファージによって貪食されるが、壊された赤血球のヘモグロビンから鉄が取り出され、再利用に備えて貯蔵される。鉄の吸収と排出による個体内外の交換量は非常に少なく、半閉鎖系の代謝によって個体内の鉄総量は一定に保たれている。そのうち7割弱は赤血球のヘモグロビンに存在し、3割弱は脾臓や肝臓に貯蔵されている。赤血球以外の細胞にも鉄は必要であるが、量的にはヘモグロビンに利用されるための鉄が大部分を占めており、赤血球造血と鉄代謝制御は密接に連携している¹⁰⁾。

鉄は高い細胞傷害性を示すため、鉄貯蔵細胞ではフェリチンに内包されて安全な形で貯蔵されている(図)。造血などにより鉄需要が増大すると、フェリチンがNCOA4(nuclear receptor coactivator 4)を介したオートファジーによって分解され、貯蔵されていた鉄はトランスポーターであるフェロポーチンによって細胞外へと排出される¹¹⁾。排出された鉄は速やかにトランスフェリン鉄となり、血流に乗って赤芽球へと運搬される。赤芽球は細胞膜上のトランスフェリン受容体を介してトランスフェリンを取り込み、鉄をヘモグロビン合成のために利用する¹⁰⁾。

鉄を細胞外へ輸送するフェロポーチンは、肝臓から分泌されるヘプシジンによって機能抑制されるため、ヘプシジン産生量が多いとヘモグロビンでの鉄利用は低下する(図)。一方、出血などによって赤血球造血が活性化されると、ヘプシジンの肝臓での産生量と血中濃度が低下し、フェロポーチンを介して貯蔵鉄がヘモグロビン合成に動員される。赤血球造血活性化時にヘプシジン産生が抑制される機序は長年不明であったが、赤芽球から分泌されるエリスロフェロンからのシグナルが肝臓におけるヘプシジン遺伝子(*HAMP*)の転写を抑制していることが明らかとなった(図)¹²⁾。

EPOは赤芽球や赤血球前駆細胞に発現する特

異的受容体(EPOR)に結合し、Janus kinase 2(JAK2)-signal transducers and activators of transcription 5(STAT5)などのシグナル伝達経路を活性化する。EPOシグナルは、トランスフェリン受容体(*TFRC*)やエリスロフェロン(*FAM132B*)など、前述した鉄代謝制御の鍵因子の遺伝子発現を強く誘導する。すなわち、血中EPO濃度が上昇すると、赤芽球の分化・増殖と鉄動員(ヘモグロビン合成)が相互に連携しながら一斉に活性化し、効率よく成熟赤血球を増やすことができる¹⁰⁾。

IV 低酸素応答系による鉄代謝制御

鉄代謝は半閉鎖系で厳密に制御されるため、食餌からの鉄吸収も制限されている。まず、食物中の非ヘム鉄(主に Fe^{3+})は、十二指腸で金属トランスポーターDMT1(duodenal metal transporter 1)によって腸管上皮に取り込まれる前に、腸管表面に発現するDCYTB(duodenal cytochrome B)によって2価鉄(Fe^{2+})へと還元される必要がある(図)。腸管上皮細胞に取り込まれても、体内の鉄レベルが十分な場合はフェリチンとして腸管上皮に留め置かれる。体内の鉄需要が高まり、血液中のヘプシジン濃度が低下すると、フェリチンからフェロポーチンを介して血管内に放出され、ヘム合成などに利用される(図)。

前述のように、低酸素応答系はHIF2 α -EPO経路を介して赤血球造血を誘導するが、鉄代謝系も低酸素応答系による直接的な制御を受ける。低酸素環境では赤血球造血のために鉄需要が増大することから、低酸素応答系がEPOだけでなく鉄代謝関連遺伝子群も一括して制御することは合理的である。NCOA4(*NCOA4*)、フェロポーチン(*SLC40A1*)、TFR(*TFRC*)、DMT1(*SLC11A2*)、DCYTB(*CYBRDI*)などの鉄代謝関連因子の遺伝子発現制御領域にはHRE(hypoxia-response element)が存在し、低酸素誘導的に発現することが報告されている¹³⁾。興味深いことに、これらの遺伝子もEPO遺伝子と同様に、HIF1 α ではなくHIF2 α によって転写誘導される(図)。

鉄代謝にかかわる遺伝子のmRNAはIRE(iron

regulatory element) という共通の配列を含んでいることが多い。IRE には IRP (iron regulatory protein) という鉄濃度を感知する蛋白質が結合し、細胞内鉄濃度に応じて mRNA の安定性または翻訳効率を調節する¹⁴⁾。HIF2 α の mRNA にも IRE が存在し、鉄濃度に応じた発現制御を受ける¹⁴⁾。また、PHD による HIF 水酸化には鉄が必要であるため、造血などによって体内の鉄需要が高まり、腸管上皮細胞から血管内に鉄が排出されると、腸管上皮細胞では PHD が失活し、HIF2 α が活性化する¹⁵⁾。その結果、DCYTB や DMT1 の発現が誘導され、十二指腸での鉄吸収量を増加させるため、食餌から体内への鉄吸収と赤血球での鉄利用が加速される。以上のように、低酸素応答系は鉄代謝系遺伝子群の発現を制御する一方で、細胞内鉄濃度による制御を受ける。

筆者らは、マウスへの鉄剤の投与や、鉄過剰餌を与えることにより、鉄貯蔵細胞に加えて REP 細胞にも鉄が優先的に沈着することを見出した¹⁶⁾。その結果、REP 細胞では HIF-PH 阻害薬による HIF2 α 活性化が阻害され、EPO 産生誘導効果が減衰した。鉄過剰による HIF2 α 抑制の分子機構は解明されていないが、REP 細胞を中心として、鉄代謝と赤血球造血、低酸素応答系の 3 者が連動していることが理解される。また、鉄剤と HIF-PH 阻害薬を併用すると互いに干渉する可能性が示唆された。

◆ おわりに

ここまで概説してきたように、全身での HIF 活性化は EPO 産生に加えて、鉄吸収と鉄利用効率も増加させるため、HIF-PH 阻害薬は ESA (erythropoiesis-stimulating agents) よりも効果的に赤血球造血を誘導できることが期待されている。その一方で、HIF は血管新生にかかわる遺伝子群の発現を誘導することから、HIF-PH 阻害薬による腫瘍や網膜症などの増悪が懸念されている。Chen らは、さまざまな HIF-PH 阻害薬の臨床研究に関する 30 報の論文を総括し、総被験者数 13,146 人に及ぶ大規模なメタ解析として HIF-PH 阻害薬の影響を報告した。この報告では、すべて

表 HIF-PH 阻害薬に関するメタ解析のまとめ

	HIF-PH 阻害薬の効果	
	vs placebo	vs ESA
ヘモグロビン	↑	→
総鉄結合能	↑	↑
ヘプシジン	↓	↓
フェリチン	↓	↓
血清鉄	↓	↓
有害事象	→	→
重篤有害事象	↑	→

(Chen ら¹⁷⁾, 2021 より作成)

の既存 HIF-PH 阻害薬は、ESA と比較してヘモグロビン値の上昇における非劣勢が証明されている(表)¹⁷⁾。また、プラセボ群だけでなく ESA 群に対しても、総鉄結合能 (TIBC) および血中トランスフェリン濃度の有意な上昇が確認された¹⁷⁾。さらに、HIF-PH 阻害薬は ESA よりもヘプシジン、フェリチンおよび血清鉄濃度を有意に低下させることが示された。これらの結果から、期待されていたとおり、HIF-PH 阻害薬は赤血球造血誘導だけでなく、鉄代謝系の改善効果も有することがわかった。一方、HIF-PH 阻害薬による重大な有害事象発生率は、プラセボと比べると高いものの ESA と同程度であった。ただし、HIF-PH 阻害薬の添付文書に記載されているとおり、血栓症の発生率の上昇が認められ、下痢や嘔吐、頭痛も確認された。HIF-PH 阻害薬は腎性貧血を対象としているため、長期間継続的に服用されるが、長期連用の影響は十分に検証されておらず、今後も継続的な観察が必要である。

腎性貧血では、ヘプシジン高値を伴う機能的鉄欠乏による ESA 抵抗性がしばしば問題となるが、HIF-PH 阻害薬はヘプシジン値を低下させることから(表)¹⁷⁾、ESA 抵抗性貧血に対する効果が期待できる。HIF-PH 阻害薬によるヘプシジン抑制の機序として、HIF が直接的にヘプシジンの遺伝子発現を抑制すると考えられることがある。実際に、マウスを低酸素環境で飼育すると、肝臓にお

けるヘプシジン発現が低下する¹⁸⁾。しかし遺伝子改変マウスを用いた最近の研究から、HIFはヘプシジンの遺伝子発現には直接作用せず、低酸素曝露によってEPO産生が誘導された結果、エリスロフェロンを介して肝ヘプシジン産生が抑制されることが示されている¹⁹⁾。HIF-PH阻害薬がESAよりも効果的にヘプシジン産生を抑制する理由は解明されていないが、HIF活性化による炎症抑制が有力な機序として考えられている。実際に、肝ヘプシジン産生は感染や炎症によって著しく増大することが知られており、HIFはさまざまな臓器の炎症を軽減させることが示されている²⁰⁾。

文 献

- 1) Yamazaki S, Souma T, Hirano I, et al : A mouse model of adult-onset anaemia due to erythropoietin deficiency. *Nat Commun* **4** : 1950, 2013
- 2) Hirano I, Suzuki N : The neural crest as the first production site of the erythroid growth factor erythropoietin. *Front Cell Dev Biol* **7** : 105, 2019
- 3) Yamazaki S, Hirano I, Kato K, et al : Defining the functionally sufficient regulatory region and liver-specific roles of the erythropoietin gene by transgene complementation. *Life Sci* **269** : 119075, 2021
- 4) Souma T, Nezu M, Nakano D, et al : Erythropoietin synthesis in renal myofibroblasts is restored by activation of hypoxia signaling. *J Am Soc Nephrol* **27** : 428-438, 2016
- 5) Tojo Y, Sekine H, Hirano I, et al : Hypoxia signaling cascade for erythropoietin production in hepatocytes. *Mol Cell Biol* **35** : 2658-2672, 2015
- 6) Suzuki N, Obara N, Pan X, et al : Specific contribution of the erythropoietin gene 3' enhancer to hepatic erythropoiesis after late embryonic stages. *Mol Cell Biol* **31** : 3896-3905, 2011
- 7) Sato K, Kumagai N, Suzuki N : Alteration of the DNA methylation signature of renal erythropoietin-producing cells governs the sensitivity to drugs targeting the hypoxia-response pathway in kidney disease progression. *Front Genet* **10** : 1134, 2019
- 8) Kobayashi H, Davidoff O, Pujari-Palmer S, et al : Epo synthesis induced by HIF-PHD inhibition is dependent on myofibroblast transdifferentiation and colocalizes with non-injured nephron segments in murine kidney fibrosis. *Acta Physiol (Oxf)*, 2022
- doi : 10.1111/apha.13826 [Online ahead of print]
- 9) Fuchs MAA, Broeker KAE, Schrankl J, et al : Inhibition of transforming growth factor β 1 signaling in resident interstitial cells attenuates profibrotic gene expression and preserves erythropoietin production during experimental kidney fibrosis in mice. *Kidney Int* **100** : 122-137, 2021
- 10) Suzuki N, Yamamoto M : Roles of renal erythropoietin-producing (REP) cells in the maintenance of systemic oxygen homeostasis. *Pflugers Arch* **468** : 3-12, 2016
- 11) Das NK, Jain C, Sankar A, et al : Modulation of the HIF2 α -NCOA4 axis in enterocytes attenuates iron loading in a mouse model of hemochromatosis. *Blood* **139** : 2547-2552, 2022
- 12) Kautz L, Jung G, Valore EV, et al : Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* **46** : 678-684, 2014
- 13) Shah YM, Matsubara T, Ito S, et al : Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. *Cell Metab* **9** : 152-164, 2009
- 14) Anderson SA, Nizzi CP, Chang YI, et al : The IRP1-HIF-2 α axis coordinates iron and oxygen sensing with erythropoiesis and iron absorption. *Cell Metab* **17** : 282-290, 2013
- 15) Schwartz AJ, Das NK, Ramakrishnan SK, et al : Hepatic hepcidin/intestinal HIF-2 α axis maintains iron absorption during iron deficiency and overload. *J Clin Invest* **129** : 336-348, 2019
- 16) Suzuki N, Matsuo-Tezuka Y, Sasaki Y, et al : Iron attenuates erythropoietin production by decreasing hypoxia-inducible transcription factor 2 α concentrations in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int* **94** : 900-911, 2018
- 17) Chen H, Cheng Q, Wang J, et al : Long-term efficacy and safety of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitors in anaemia of chronic kidney disease : A meta-analysis including 13,146 patients. *J Clin Pharm Ther* **46** : 999-1009, 2021
- 18) Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, et al : The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* **110** : 1037-1044, 2002
- 19) Tojo Y, Sekine H, Hirano I, et al : Hypoxia signaling cascade for erythropoietin production in hepatocytes. *Mol Cell Biol* **35** : 2658-2672, 2015
- 20) Yan Z, Xu G : A novel choice to correct inflammation-induced anemia in CKD : oral hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor Roxadustat. *Front Med (Lausanne)* **7** : 393, 2020

* * *