

## 赤芽球系培養細胞における (プロ)レニン受容体発現

金子 桐子, 西山 浩史, 柴崎 瑛子, 高橋 和広

東北大学大学院医学系研究科 内分泌応用医科学分野

### Expression of (Pro)Renin Receptor in Human Erythroid Cell Lines

Kiriko KANEKO, Hiroshi NISHIYAMA, Akiko SHIBASAKI and Kazuhiro TAKAHASHI

*Department of Endocrinology and Applied Medical Science, Tohoku University Graduate School of Medicine*

Key words : renin-angiotensin system, erythropoiesis

The renin-angiotensin system (RAS) is known to enhance erythropoiesis. (Pro)renin receptor ((P)RR), a specific receptor for renin and prorenin, has recently been identified. (P)RR is widely expressed in various tissues. Binding of prorenin to (P)RR leads to non-proteolytic activation of prorenin, and directly activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) or Wnt/ $\beta$ -catenin signaling independently from RAS. Recently, we reported that erythropoietin and inflammatory cytokine IFN- $\gamma$  increased (P)RR expression in erythroid cell lines. It has been reported that HRG-1, a heme transporter essential for erythropoiesis in zebrafish, interacts with vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase (v-ATPase) and enhances v-ATPase activity in yeast. Moreover, the association of (P)RR and v-ATPase is functional and essential for the survival of certain cells, such as cardiomyocytes and podocytes. These reports and our findings raised the possibility that (P)RR might be related to erythropoiesis, perhaps through v-ATPase. Therefore, these new observations suggest that the ability of new (P)RR function for erythropoiesis. The present review will summarize briefly our knowledge of the relation between (P)RR and erythropoiesis.

#### はじめに

レニン・アンジオテンシン系 (renin-angiotensin system, RAS) は血圧と電解質均衡の調節において主要な役割を担っている<sup>1)</sup> (図1)。特に、アンジオテンシン II (AngII) は赤芽球前駆細胞の成長因子の1つとして赤血球産生を促進する糖蛋白ホルモンであるエリスロポエチン (erythropoietin, EPO) と協調して細胞増殖に作用することから<sup>2)</sup>, RAS が赤血球合成に関与する可能性が示唆されている。さらに、AngII は EPO の分泌促進物質として EPO 濃度を維持する働きも持つ<sup>2)</sup> (図1)。実際にアンジオテンシン変換酵素 (angiotensin

converting enzyme, ACE) 阻害剤は濃度依存的に血液量に影響を与えることなく正常ラットのヘマトクリット値を低下させる<sup>3)</sup>。さらに ACE ノックアウトマウスは腎臓機能が正常であるにもかかわらず貧血であることから、AngII は赤血球合成の促進が示唆される<sup>4)</sup>。

(プロ)レニン受容体 ((pro)renin receptor, (P)RR) はレニンとレニン前駆体であるプロレニンの特異的受容体として2002年にNguyenらによって同定された<sup>5)</sup>。(P)RRは350アミノ酸で構成される一回膜貫通ドメインを持つ膜タンパクで、プロレニンと結合すると(P)RRは非分解的にプロレニンの酵素的活性を増大させ、アンジオテンシ

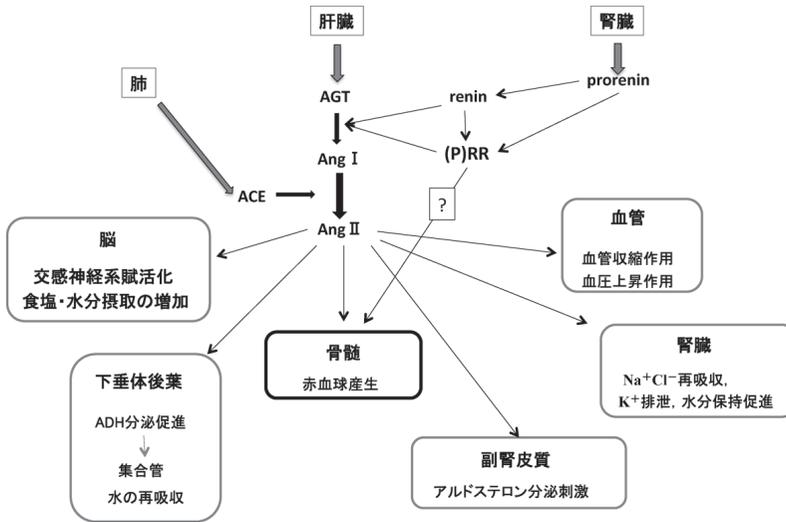


図1. レニン・アンジオテンシン系と (P)RR。AGT, アンジオテンシノーゲン; ACE, アンジオテンシン変換酵素; Ang I, アンジオテンシン I; Ang II, アンジオテンシン II

ノゲンをアンジオテンシン I に変換して RAS を活性化する (図1)。また一方では, RAS と独立した働きを持ち, 直接 MAP Kinase である ERK1/2 のリン酸化を活性化, 標的因子の転写を誘導して細胞増殖や細胞傷害を惹起する。(P)RR の遺伝子は ATPase 6 accessory protein 2 (ATP6ap2) にコードされている。すなわち, (P)RR は液胞型プロトンポンプ (vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase, v-ATPase) に付随する小タンパクでもある<sup>6,7)</sup>。この2つのタンパク質, (P)RR と v-ATPase の付随関係は機能性を示し, 心筋細胞や糸球体上皮にある有足細胞などの特定細胞の生存に必須である<sup>8,9)</sup>。さらに, 発生における幹細胞分化や胚発生だけでなく, 悪性腫瘍を含む疾患の発症に非常に重要である Wnt/ $\beta$ -カテニン経路にも (P)RR は関与する<sup>7,10)</sup>。

(P)RR は心臓, 腎臓や脳を含む様々な組織に広く発現する<sup>11-13)</sup>。しかしながら, その機能と発現調節機構の多くは明らかではない。我々は赤血球における (P)RR の発現機構の解明を試みており, 本総説では新たな (P)RR の機能とその発現調節機構について概説する。

### 低酸素刺激と (P)RR

我々は, 赤芽球における (P)RR の発現をはじめて明らかにした<sup>14)</sup>。他方, その機能についての多くは明らかではない。これまでに赤芽球系培養細胞を用いて低酸素刺激が複数の経路によってヘモグロビン合成を誘導する可能性が示唆されている<sup>15)</sup>。ヘム合成を誘導する TGF- $\beta$ 1 が低酸素刺激により発現が誘導されること<sup>15)</sup>, MAPK/ERK1/2 経路によるシグナル経路の下流に存在する標的遺伝子のひとつが TGF- $\beta$  であることから<sup>5)</sup>, 低酸素刺激および, オートクラインもしくはパラクライン TGF- $\beta$ 1 のフィードバック機構が (P)RR に対して存在するか否かについて, まず検証した。しかしながら, TGF- $\beta$ 1, 低酸素刺激のいずれも赤芽球系培養細胞 YN-1, YN-1-0-A において (P)RR 発現に影響を与えなかった (図2, 3)<sup>16,17)</sup>。低酸素刺激は低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor, HIF) の分解を抑制し, 細胞内へ蓄積を促進する<sup>18)</sup>。特に HIF-1 $\alpha$  は低酸素ストレスへの応答に重要な転写因子であり, 赤血球産生に必要な EPO 発現にも直接関わるが<sup>18)</sup>, 我々が検討に用いた赤芽球系培養細胞では (P)RR の低酸素によ

赤芽球系培養細胞における (プロ)レニン受容体発現

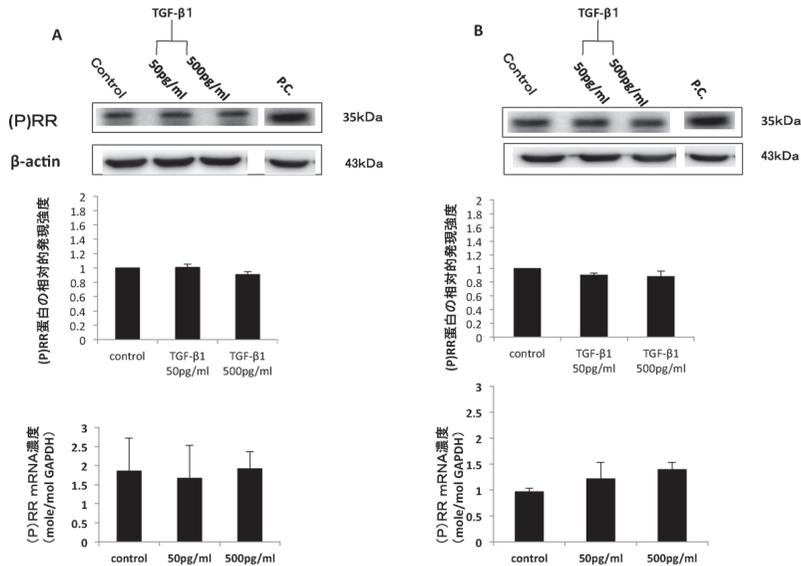


図 2. TGF-β1 添加 48 時間後の (A) YN-1, (B) YN-1-0-A 細胞における (P)RR 発現を Western Blot 解析 (上段), 中段: 上段を数値化して β-アクテンで補正。下段: (P)RR mRNA を Real Time PCR 法を行い, 18S で補正。(文献 16 から引用。一部改変。)

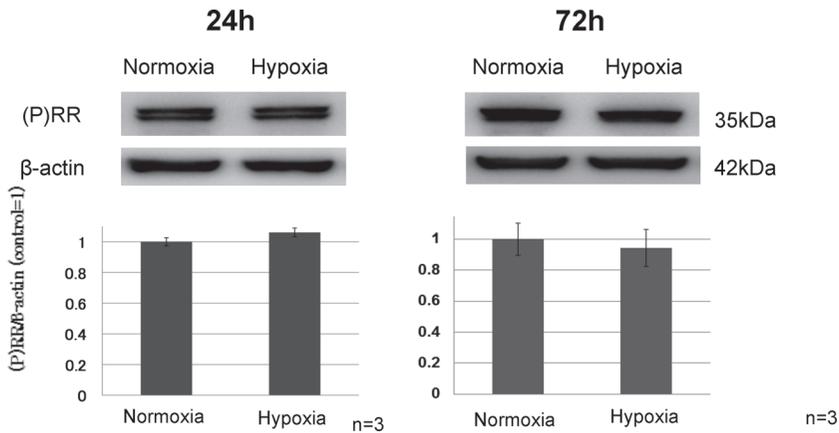


図 3. 1% 酸素環境下で (A) 24 時間, (B) 72 時間培養を行った YN-1 細胞における (P)RR 発現を Western Blot 解析 (上段), 下段: 上段を数値化して β-アクテンで補正。(文献 17 から引用。)

る発現変化は認められなかった。しかしながら, HIF-1α と (P)RR の発現の直接的な関係は検討しておらず, 非赤芽球系細胞において, ほぼ全ての細胞に発現する (P)RR が HIF-1α の関与するストレス応答にも関与する可能性は十分に考えられ, 更なる検討が必要である。

EPO と (P)RR

一方, 赤血球産生に必須である EPO の添加は (P)RR mRNA 発現を 1.68 倍に増加させた ( $p < 0.01$ ) (図 4)。しかしながら, EPO の分泌刺激作用をもつ AngII の添加では (P)RR の発現の

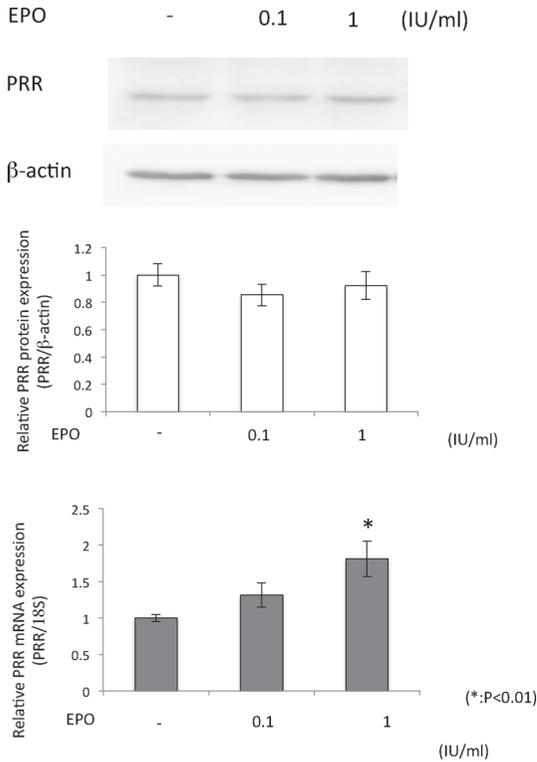


図 4. EPO 添加 48 時間後の YN-1-0-A 細胞における (P) RR 発現を Western Blot 解析 (上段), 中段: 上段を数値化して  $\beta$ -アクチンで補正補正。下段: (P) RR mRNA を Real Time PCR 法を行い, 18S で補正。(n=6) \* $P < 0.05$ 。(文献 15 から, Elsevier の許可のもと転載。一部改変。)

変化を認めなかった (図 5)<sup>17)</sup>。

EPO は、主に腎臓から分泌され骨髄に作用する。赤芽球には、EPO 受容体が発現している<sup>15)</sup>。培地に添加された EPO によって発現が誘導された (P)RR は、赤血球産生に関わる可能性が考えられた。この検討に用いた YN-1 細胞は EPO の添加によるヘモグロビン合成誘導は認められなかったことから<sup>19)</sup>、(P)RR はむしろ細胞増殖に関与する可能性が考えられる。また、赤芽球系培養細胞において低酸素刺激は直接的に (P)RR の発現へ影響しなかった (図 3) が、EPO は HIF-1 $\alpha$  の標的遺伝子の 1 つであることから<sup>18)</sup>、生体内では低酸素刺激によって細胞内に蓄積した HIF-1 は EPO の産生誘導を介して間接的に (P)

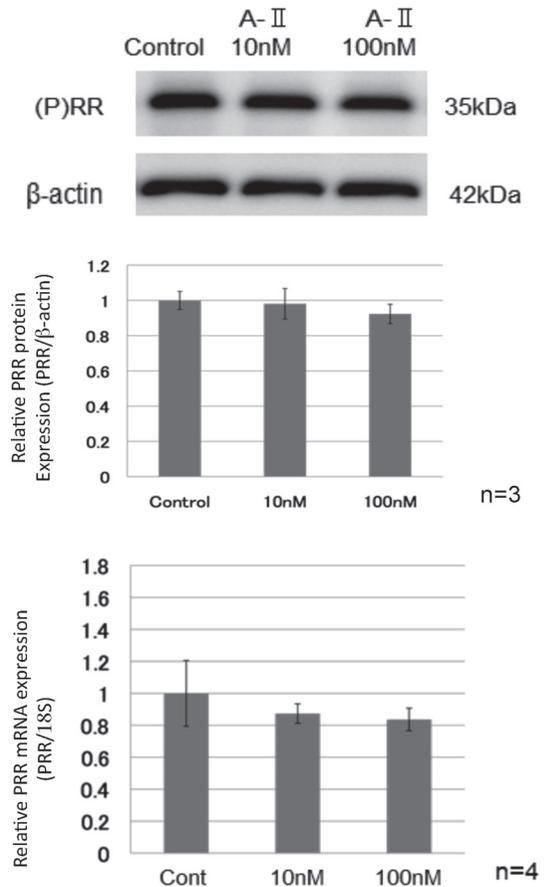


図 5. Ang II 添加 48 時間後の YN-1 細胞における (P) RR 発現を Western Blot 解析 (上段), 中段: 上段を数値化して  $\beta$ -アクチンで補正。下段: (P) RR mRNA を Real Time PCR 法を行い, 18S で補正。(文献 17 から引用。)

RR 発現に関与する可能性が考えられる。また、最近ヘムトランスポーターである HRG-1 が v-ATPase と付随して機能することが報告された<sup>20)</sup>。HRG-1 はセブラフィッシュにおいてヘム合成に必須因子であり<sup>21)</sup>、v-ATPase は (P)RR と結合することでその機能を維持することから、(P)RR は直接もしくは間接的にヘム合成に関与する可能性も考えられ、今後の検討が必要である。

#### サイトカインと (P)RR 発現

炎症性サイトカインであるインターロイキン-1 $\beta$

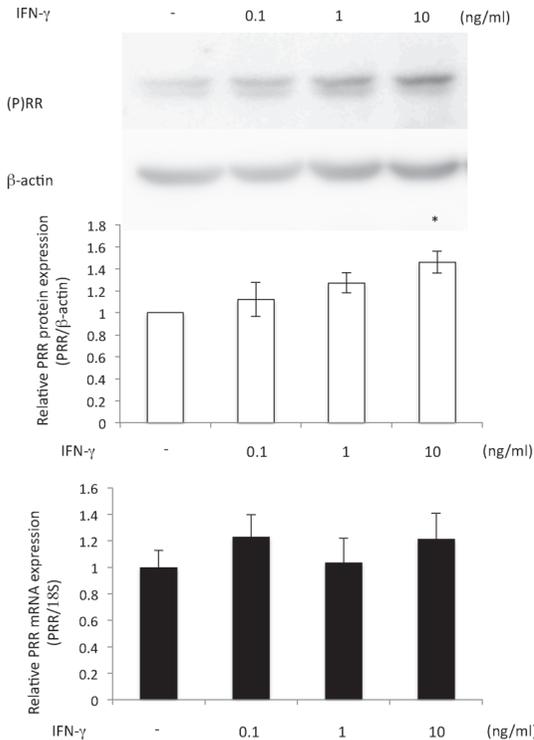


図 6. IFN- $\gamma$  添加 48 時間後の YN-1-0-A 細胞における (P)RR 発現を Western Blot 解析 (上段), 中段: 上段を数値化して  $\beta$ -アクチンで補正。下段: (P)RR mRNA を Real Time PCR 法を行い, 18S で補正。(n=6) \* $P < 0.05$ 。(文献 15 から, Elsevier の許可のもと転載。一部改変。)

(IL-1 $\beta$ ) とインターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) は腎臓における EPO 産生を抑制し, 赤血球産生を抑制することが報告されている<sup>22,23</sup>。EPO の添加により (P)RR 発現が誘導されたことから (図 4), これらの炎症性サイトカインが直接 (P)RR 発現に関与する可能性の検討を行った。IL-1 $\beta$  はいずれの検討条件においても変化はなかった<sup>16</sup>。一方, IFN- $\gamma$  は添加後 48 時間の (P)RR タンパク質の発現が誘導されたが, mRNA の発現に変化は認められなかった (図 6)。この結果は, IFN- $\gamma$  は赤芽

球系培養細胞 YN-1-0-A 細胞において転写活性の誘導ではなく, (P)RR タンパク質の半減期を延長し, 細胞内に (P)RR タンパクを蓄積する可能性を示唆した。また, IFN- $\gamma$  は EPO を介して赤血球産生に影響があるだけでなく, 赤芽球に直接作用することも明らかとなった。

近年, 臨床的に心疾患, 腎疾患, 貧血が相互に影響し合う心腎貧血症候群の概念の重要性が認識されつつある<sup>24,25</sup>。慢性心不全における貧血の合併は, 死亡率を上昇させる因子のひとつである。慢性心不全の多くの例においては, 炎症性サイトカインの過多により慢性腎不全を併発し, 腎機能低下による EPO 産生抑制と骨髄における炎症性サイトカインによる EPO 反応性の抑制により貧血も併発する<sup>25</sup>。これらの報告と我々の結果より, 心腎貧血症候群における貧血においては, 炎症性サイトカインのひとつである IFN- $\gamma$  が (P)RR の細胞内蓄積を誘導することで赤芽球の増殖を誘導し, 代償性機構を担っている可能性が考えられた (図 7)。

## おわりに

これまで糖尿病性腎症や高血圧, 心血管/腎疾患における (P)RR の重要性は多数報告されているが<sup>11,12,26-28</sup>, 赤芽球における (P)RR の発現意義および調節機構の多くは未解明である。しかしながら, これらの結果から赤芽球における (P)RR 発現には複数の調節機構の存在が考えられ, その機構解明は, 心腎貧血症候群や炎症性貧血などある種の病態生理を持つ貧血治療のみならず, 赤芽球分化機構の破綻による疾患の新たな治療への寄与が期待できる。

## 謝 辞

本稿は, 柴崎瑛子氏と西山浩史氏が, 東北大学大学院医学系研究科修士学位論文として報告した内容を, 総説としてまとめたものである。

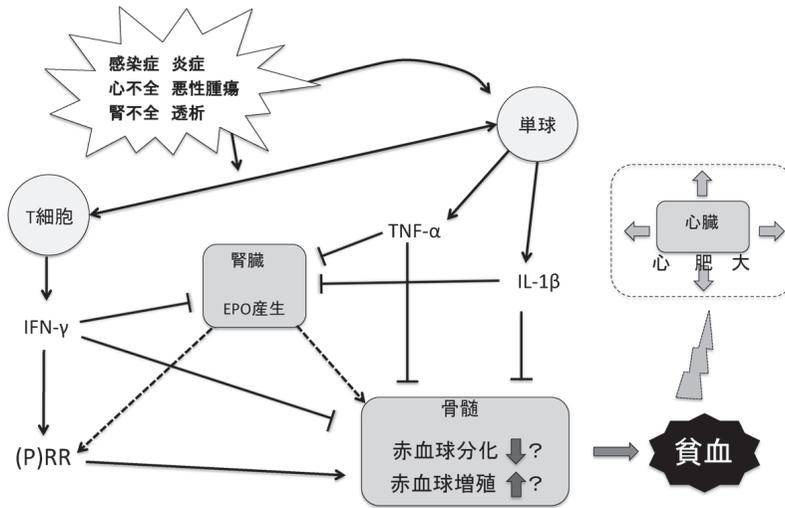


図7. 心腎貧血症候群の貧血発症機構における (P)RR と炎症性サイトカインの想定される役割。EPO, エリスロポエチン; IFN- $\gamma$ , インターフェロン- $\gamma$ ; IL-1 $\beta$ , インターロイキン-1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$ , 腫瘍壊死因子- $\alpha$ 。

## 文 献

- 1) Weir, M.R., Dzau, V.J. : The renin-angiotensin-aldosterone system : a specific target for hypertension management, *Am. J. Hypertens.*, **12**, 205S-213S, 1999
- 2) Vlahakos, D.V., Marathias, K.P., Madias, N.E. : The role of the renin-angiotensin system in the regulation of erythropoiesis, *Am. J. Kidney Dis.*, **56**, 558-565, 2010
- 3) Gould, A.B., Goodman, S.A. : Effect of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on blood pressure and erythropoiesis in rats, *Eur. J. Pharmacol.*, **181**, 225-234, 1990
- 4) Cole, J., Ertoy, D., Lin, H., Sutliff, R.L., Ezan, E., Guyene, T.T., Capecchi, M., Corvol, P., Bernstein, K.E. : Lack of angiotensin II-facilitated erythropoiesis causes anemia in angiotensin-converting enzyme-deficient mice, *J. Clin. Invest.*, **106**, 1391-1398, 2000
- 5) Nguyen, G., Delarue, F., Burckle, C., Bouzahir, L., Giller, T., Sraer, J.D. : Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin, *J. Clin. Invest.*, **109**, 1417-1427, 2002
- 6) Burckle, C., Bader, M. : Prorenin and its ancient receptor, *Hypertension*, **48**, 549-551, 2006
- 7) Nguyen, G. : Renin, (pro)renin and receptor : an update, *Clin. Sci. (Lond.)*, **120**, 169-178, 2011
- 8) Kinouchi, K., Ichihara, A., Sano, M., Sun-Wada, G.H., Wada, Y., Kurauchi-Mito, A., Bouda, K., Narita, T., Oshima, Y., Sakoda, M., Tamai, Y., Satoh, H., Fukuda, K., Itoh, H. : The (pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase assembly in murine cardiomyocytes, *Circ. Res.*, **107**, 30-34, 2010
- 9) Oshima, Y., Kinouchi, K., Ichihara, A., Sakoda, M., Kurauchi-Mito, A., Bokuda, K., Narita, T., Kurosawa, H., Sun-Wada, G.H., Wada, Y., Yamada, T., Takemoto, M., Saleem, M.A., Quaggin, S.E., Itoh, H. : Prorenin receptor is essential for normal podocyte structure and function, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **22**, 2203-2212, 2011
- 10) Cruciat, C.M., Ohkawara, B., Acebron, S.P., Karaulanov, E., Reinhard, C., Ingelfinger, D., Boutros, M., Niehrs, C. : Requirement of prorenin receptor and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase-mediated acidification for Wnt signaling, *Science*, **327**, 45-463, 2010
- 11) Hirose, T., Mori, N., Totsune, K., Morimoto, R., Maejima, T., Kawamura, T., Metoki, H., Asayama, K., Kikuya, M., Ohkubo, T., Kohzaki, M., Takahashi, K., Imai, Y. : Gene expression of (pro)renin receptor is upregulated in hearts and kidneys of rats with congestive heart failure, *Peptides*, **30**, 2316-2322, 2009
- 12) Hirose, T., Mori, N., Totsune, K., Morimoto, R., Maejima, T., Kawamura, T., Metoki, H., Asayama, K., Kikuya, M., Ohkubo, T., Kohzaki, M., Takahashi, K., Imai,

- Y. : Increased expression of (pro)reninreceptor in the remnant kidneys of 5/6 nephrectomized rats, *Regul. Pept.*, **159**, 93-99, 2010
- 13) Takahashi, K., Yamamoto, H., Hirose, T., Hiraishi, K., Shoji, I., Shibasaki, A., Kato, I., Kaneko, K., Sasano, H., Sato, F., Totsune, K. : Expression of (pro)renin receptor in human kidneys with end-stage kidney disease due to diabetic nephropathy, *Peptides*, **31**, 1405-1408, 2010
- 14) Kaneko, K., Nishiyama, H., Ohba, K., Shibasaki, A., Hirose, T., Totsune, K., Furuyama, K., Takahashi, K. : Expression of (pro)renin receptor in human erythroid cell lines and its increased protein accumulation by interferon- $\gamma$ , *Peptides*, **37**, 285-289, 2012
- 15) Kaneko, K., Furuyama, K., Aburatani, K., Shibahara, S. : Hypoxia induces erythroid-specific 5-aminolevulinic synthase expression in human erythroid cells through transforming growth factor- $\beta$  signaling, *FEBS J.*, **276**, 1370-1382, 2009
- 16) 柴崎瑛子 : 赤芽球性細胞 YN-1 における (プロ)レニン受容体発現の検討, 東北大学大学院医学系研究科修士学位論文, 2011
- 17) 西山浩史 : 赤芽球性細胞 YN-1 における (プロ)レニン受容体発現の検討—トリヨードサイロニンとエリスロポエチンの効果, 東北大学大学院医学系研究科修士学位論文, 2013
- 18) Semenza, G.L., Nejfelt, M.K., Chi, S.M., Antonarakis, S.E. : Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **88**, 5680-5684, 1991
- 19) Nagai, T., Harigae, H., Furuyama, K., Munakata, H., Hayashi, N., Endo, K., Sassa, S., Yamamoto, M. : 5-Aminolevulinic synthase expression and hemoglobin synthesis in a human myelogenous leukemia cell line, *J. Biochem.*, **121**, 487-495, 1997
- 20) Fogarty, F.M., O'Keefe, J., Papkovsky, D., Ayllon, V., O'Connor, R. : HRG-1 enhances cancer cell invasive potential and couples glucose metabolism to cytosolic/extracellular pH gradient regulation by the vascular- $H^+$  ATPase, *Oncogene*, 1-11, 2013
- 21) White, C., Yuan, X., Schmidt, P.J., Bresciani, E., Samuel, T.H., Campagna, D., Hall, C., Bishop, K., Calicchio, M.L., Lapierre, A., Ward, D.M., Liu, P., Fleming, M.D., Hamza, I. : HRG1 is essential for heme transport from the phagolysosome of macrophages during erythropoiesis, *Cell Metab.*, **17**, 261-270, 2013
- 22) Maury, C.P., Andersson, L.C., Teppo, A.M., Partanen, S., Juvonen, E. : Mechanism of anaemia in rheumatoid arthritis : demonstration of raised interleukin 1 beta concentrations in anaemic patients and of interleukin 1 mediated suppression of normal erythropoiesis and proliferation of human erythroleukaemia (HEL) cells in vitro, *Ann. Rheum. Dis.*, **47**, 972-978, 1988
- 23) Ortega, J.A., Ma, A., Shore, N.A., Dukes, P.P., Merigan, T.C. : Suppressive effect of interferon on erythroid cell proliferation, *Exp. Hematol.*, **7**, 145-150, 1979
- 24) Silverberg, D.S., Wexler, D., Iaina, A. : The role of anemia in the progression of congestive heart failure. Is there a place for erythropoietin and intravenous iron?, *J. Nephrol.*, **17**, 749-761, 2004
- 25) Silverberg, D.S. : The role of erythropoiesis stimulating agents and intravenous (IV) iron in the cardio renal anemia syndrome, *Heart Fail. Rev.*, **16**, 609-614, 2011
- 26) Ichihara, A., Hayashi, M., Kaneshiro, Y., Suzuki, F., Nakagawa, T., Tada, Y., Koura, Y., Nishiyama, A., Okada, H., Uddin, M.N., Nabi, A.H., Ishida, Y., Inagami, T., Saruta, T. : Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for non-proteolytic activation of prorenin, *J. Clin. Invest.*, **114**, 1128-1135, 2004
- 27) Ichihara, A., Itoh, H., Inagami, T. : Critical roles of (pro)renin receptor-bound prorenin in diabetes and hypertension : sallies into therapeutic approach, *J. Am. Soc. Hypertens.*, **2**, 15-19, 2008
- 28) Takahashi, K., Hirose, T., Mori, N., Morimoto, R., Kohzaki, M., Imai, Y., Totsune, K. : The renin-angiotensin system, adrenomedullins and urotensin II in the kidney : possible renoprotection via the kidney peptide systems, *Peptides*, **30**, 1575-1585, 2009