

# 腎線維化と腎性貧血

Renal fibrosis and anemia

相馬友和\*<sup>1</sup> 鈴木教郎\*<sup>2</sup>

Tomokazu SOUMA and Norio SUZUKI

## はじめに

エリスロポエチン(EPO)は、赤血球造血に必須のホルモンであり、成人では尿細管間質に存在する腎EPO産生細胞(renal erythropoietin-producing細胞: REP細胞)から分泌される。慢性腎臓病では、尿細管間質における筋線維芽細胞の出現・増幅による腎線維化が共通の増悪機序として知られている。また、線維化に伴ってEPO産生不全が生じ、腎性貧血を発症することから、慢性腎臓病における線維化とEPO産生不全の関連性が示唆されてきた。われわれは、これまでに蓄積してきたEPO遺伝子発現制御機構の知見に基づき、REP細胞の単離解析技術を確立し、REP細胞の細胞運命を追跡することに成功した。その結果、腎線維化病態における筋線維芽細胞の由来はREP細胞であることを見出した。また、筋線維芽細胞に形質転換したREP細胞では、低酸素応答システムが破綻するためにEPO産生不全に陥ることを明らかにした。さらに、この形質転換は可逆的であり、腎病態の改善により筋線維芽細胞がREP細胞の性質を取り戻すことを発見した。本稿では、腎疾患に伴う線維化および貧血発症の双方におけるREP細胞の関与について、最近の研究成果を中心に解説する。

## 腎EPO産生細胞「REP細胞」

EPOは赤血球造血に必須の糖蛋白質ホルモンであり、血中のEPO濃度は低酸素や貧血に応答して正常時の1,000倍まで上昇することが報告されている<sup>1,2)</sup>。EPOは骨髄赤血球前駆細胞に発現するEPO受容体に作用し、細胞内にアポ

トシス抑制、増殖、分化のシグナルを伝達することにより赤血球造血を促す<sup>3,4)</sup>。高地居住者や高地帰還者の血液粘度が高いことや、脱血ウサギの血清が赤血球造血を促進することなどから、EPOの存在は19世紀には示唆されていた<sup>5)</sup>。しかし、1977年に宮家らが再生不良性貧血患者の尿2,550Lから高純度のEPO精製に成功し、アミノ酸配列を解明するまでに長い年月を要した<sup>5,6)</sup>。その後、1985年にEPO遺伝子がクローニングされると<sup>7)</sup>、遺伝子組換え技術によるEPO製剤の開発が進められ、現在までに多くの腎性貧血患者に使用されている。組換え型EPO製剤の成功によって、EPOは分子生物学が臨床応用に役立つことを燦然と示してきた。また、EPO遺伝子の発現制御解析から、低酸素誘導性転写因子(hypoxia inducible factor: HIF)および同因子のDNA結合配列(hypoxia responsive element: HRE)が同定され、現在の低酸素応答機構研究の礎となった<sup>8)</sup>。

EPOが低酸素刺激に応じて腎臓で作られることは古くから知られていたが<sup>5)</sup>、さまざまな細胞で構成される腎臓において、EPO産生を担当する細胞の正体については、尿細管上皮細胞、糸球体メサンギウム細胞、間質線維芽細胞など、諸説が乱立していた<sup>9)</sup>。われわれは、EPO遺伝子の制御機構解析を進める目的で、EPO遺伝子の制御領域によって緑色蛍光蛋白質(green fluorescent protein: GFP)を発現する細菌人工染色体(bacterial artificial chromosome: BAC)レポータートランスジェニックマウス(Tg-EPO-GFPマウス)およびEPO遺伝子座にGFP cDNAを挿入したEPO-GFPノックインマウス(KI-EPO-GFPマウス, *Epo*<sup>GFP/wt</sup>)を樹立した<sup>9~11)</sup>。これらのマウスでは、EPO遺伝子を発現する細胞が同時にGFPを発現するため、平常時は蛍光標識された細胞をほとんど観察することができないが、マウスへの瀉血や低酸素曝露によって、多くの細胞が腎EPO産生細胞として可視化された。その結果、尿細管間質に存在し、

\*1 ノースウエスタン大学腎臓内科・心臓血管研究所

\*2 東北大学大学院医学系研究科新医学領域創生分野

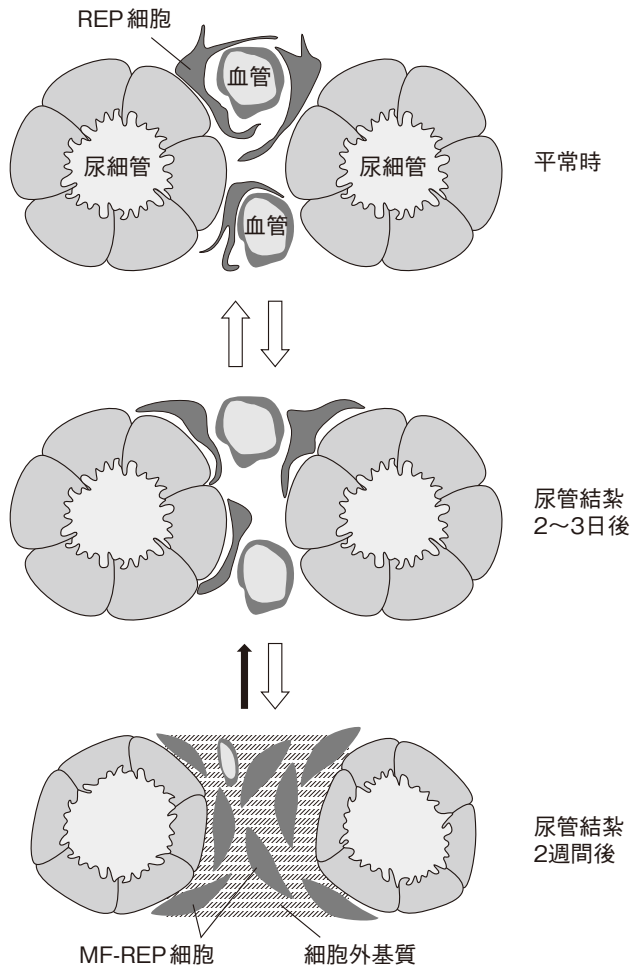


図1 腎線維化に伴う REP 細胞の形質転換

REP 細胞は尿管間質の線維芽細胞様細胞であり、平常時は突起を毛細血管周囲に伸ばしている。尿管結紮によって腎障害を惹起して数日経つと、REP 細胞の形状が変化し、血管から離れて尿管側に移行する。腎障害が進行すると、間質には REP 細胞由来の筋線維芽細胞 (MF-REP 細胞) と MF-REP 細胞が産生するコラーゲン線維などの細胞外基質が充満し、腎線維化が進む。障害による REP 細胞の形質転換は可逆的であり、病態環境の改善により、元の性質を取り戻す。

PDGFR $\beta$  (platelet-derived growth factor receptor  $\beta$ ) および CD73 といった線維芽細胞のマーカー因子を発現する細胞が腎臓で EPO 産生を担っていることが明らかとなった (図 1)<sup>10,11)</sup>。われわれは、これらの細胞を「REP 細胞」と命名し、性状解析を進めている。REP 細胞は、神経系細胞のマーカー因子である MAP2 (microtubule-associated protein 2) や NFL (neurofilament light polypeptide) も発現しており、神経系の細胞の特質を有することが示唆されている<sup>10,12,13)</sup>。

## REP 細胞の局在

胎生後期での赤血球造血は肝実質細胞からの EPO 産生によって支持されており、EPO 遺伝子ノックアウトマウス (*Epo*<sup>GFP/GFP</sup>) は胎生 12.5 日に重篤な貧血により死亡する<sup>14)</sup>。肝臓での EPO 遺伝子発現は、出生後も貧血時に誘導されるが、その発現量は REP 細胞に比べて著しく少ない<sup>15)</sup>。また、EPO 遺伝子の転写終結点下流の領域 (hepatic enhancer: EPO-HE) が肝臓での EPO 遺伝子発現に必須であるが、腎臓での EPO 発現には関与しないことから、肝臓と腎臓では異なる制御システムによって EPO 産生が調節されていると考えられる<sup>15)</sup>。

EPO 欠損マウスが胎生致死となるため、成体マウスにおける腎 EPO 産生の役割を検討することは困難であった。そこでわれわれは、前述の EPO-HE によって EPO を発現するトランスジーン (*Tg-EPO*) を作製し、EPO 欠損マウスに導入した (*Tg-EPO : Epo*<sup>GFP/GFP</sup>)。このマウスは、肝臓での EPO 産生を回復したことにより、胎生致死を回避したものの、成体腎での EPO 産生能を欠損しているために、生後 2 週以降に重篤な貧血を呈した<sup>16)</sup>。貧血の症状は赤血球数が正常の 1/3 程度にまで低下する重篤なものであり、EPO 製剤の投与により貧血から回復したことから、本マウスは EPO 欠乏性貧血のモデルマウス (以下、inherited super-anemic mice: ISAM) として有用であることがわかった。

ISAM は両 EPO 遺伝子座が GFP cDNA に置換されているため、本来の EPO 産生細胞は EPO に代わって GFP を発現する。また、ISAM の慢性貧血によって EPO 遺伝子座の転写活性が亢進しているため、GFP 発現による REP 細胞の標識効率が非常に高い。そこで、2 光子顕微鏡を用いて ISAM 腎臓の生体イメージング解析を行ったところ、REP 細胞の突起が尿管周囲の毛細血管を抱きかかえており、形態学的に尿管間質の周皮細胞様であることが判明した (図 1)<sup>17)</sup>。

さらに効率良く REP 細胞を検出するために、EPO 遺伝子の制御領域によって Cre 組換え酵素を発現するトランスジェニックマウス (EPO-Cre マウス) を作製した<sup>16)</sup>。Cre による遺伝子組換えが生じた細胞で tdTomato (赤色蛍光蛋白質) を発現するレポーターマウス (Rosa26-tdTomato マウス) を EPO-Cre マウスと交配することにより、EPO 遺伝子 (EPO-Cre トランスジーン) が一度でも転写活性化したことがある細胞を赤色蛍光で永久標識することが可能となった。このマウスと ISAM を交配して得た複合遺伝子改変マウス (ISAM : Rosa26-tdTomato : EPO-Cre : ISAM-REC) で

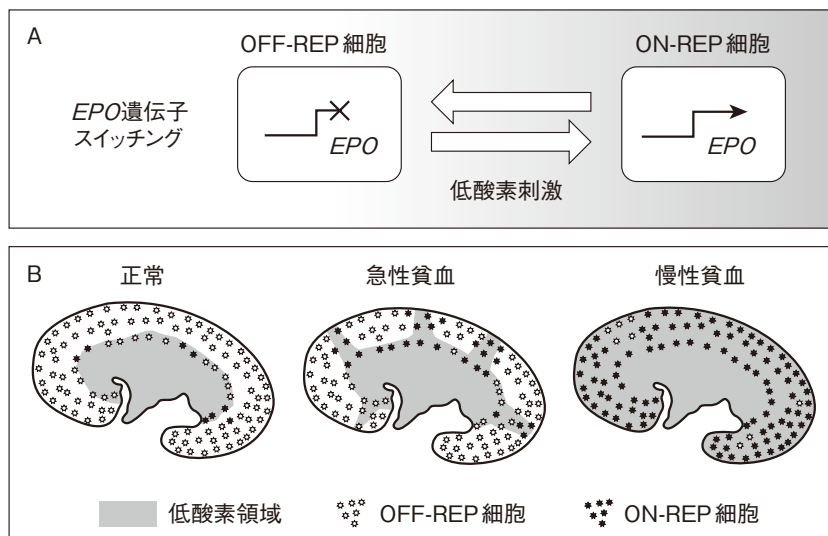


図2 OFF-REP細胞とON-REP細胞

A: REP細胞におけるEPO産生は、主にEPO遺伝子の転写レベルで制御されている。EPO遺伝子発現は、個々の細胞への酸素供給量に応じてON-OFF制御(EPO遺伝子スイッチング)されており、低酸素を感知した細胞がEPO産生を開始する。B: REP細胞は皮髄境界から皮質全域の尿管間質に分布するが、平常時には酸素供給量の少ない皮髄境界に存在する少数のREP細胞のみがEPO産生を担っている。貧血などにより、腎内の低酸素領域が拡大すると、全REP細胞に対するON-REP細胞の割合が増大し、血中EPO濃度を上昇させる。

は、Creの発現が最大限に誘導されるため、ほぼすべてのEPO産生能を有する細胞がtdTomato発現によって標識された<sup>16)</sup>。その結果、腎皮質および髄質外層の間質に存在する線維芽細胞様細胞の大部分がREP細胞であることが判明した。また、平常時は多くのREP細胞でEPO産生を休止しており(OFF-REP細胞)、皮髄境界に位置する少数のREP細胞(ON-REP細胞)のみでEPO産生が担われていることがわかった。貧血や低酸素刺激に応じて、皮質領域のREP細胞でもEPO産生が開始され、全REP細胞に対するON-REP細胞の割合が増加する(図2)<sup>2,16)</sup>。

### REP細胞と腎線維化

慢性腎臓病の進行に伴い、尿管上皮細胞の萎縮と間質線維化が生じる。線維化は組織修復における必須の過程であるが、線維化が進行することにより組織構築が破壊され、臓器不全に至ると考えられている<sup>18~20)</sup>。また、間質線維化の進行に伴う腎EPO産生の低下が腎性貧血発症の機序となることが1997年にマウスを用いた解析から示唆されていた<sup>21)</sup>。われわれは、ISAMおよびISAM-RECマウスを用いて、腎線維化におけるREP細胞の関与について研

究を進めている。ISAMに片腎尿管結紮(UUO)による腎障害を施したところ、障害腎におけるEPO-GFP mRNA発現量(腎EPO産生能)が急激に減少した。また、施術後2日目にはREP細胞の多くが $\alpha$ SMA( $\alpha$ 平滑筋アクチン)を産生する筋線維芽細胞(myofibroblast)へと形質転換していた<sup>13,22)</sup>。以上の結果から、腎障害によってREP細胞が筋線維芽細胞「MF-REP細胞」に形質転換し、EPO産生能を喪失することが明らかになった(図1)<sup>23)</sup>。興味深いことに、タモキシフェン投与は、線維化腎におけるEPO産生低下を軽減し、MF-REP細胞からのコラーゲン産生を抑制する<sup>13)</sup>。したがって、REP細胞を標的としたタモキシフェン投薬は腎線維化と腎性貧血を同時に治療する可能性がある。

平常時のREP細胞は尿管間質で毛細血管を抱きかかえて存在しているが、尿管結紮によって内皮細胞から剝離し、尿管側に突起を向けることがISAMの生体イメージング解析によって明らかになった(図1)<sup>17)</sup>。尿管の障害が周囲の細胞に波及し、間質の線維化につながる事が報告されている<sup>24)</sup>。また、腎臓病進行時には毛細血管網が粗くなるため、腎内の虚血・低酸素状態が重篤化すると考えられている<sup>25)</sup>。したがって、REP細胞の形態変化は腎線維化の病態を理解するうえで非常に重要な現象である。



尿管結紮から2週間後のマウス腎臓は末期線維化に陥っており、間質はMF-REP細胞に占拠される。すなわち、REP細胞は線維化腎における筋線維芽細胞の主要な供給源であり、腎線維化と腎性貧血は共にREP細胞の異変によって生じるといえる<sup>22,23</sup>。臨床的にも、糖尿病性腎症患者におけるヘモグロビン濃度とEPO血中濃度の積は、慢性腎臓病のステージとよく相関する<sup>26</sup>。EPOの血中半減期が4~8時間であることから、ヘモグロビン濃度とEPO血中濃度の積は、腎間質機能不全進行の指標となると考えられる。

これまでに、線維化腎における筋線維芽細胞の由来について、間質線維芽細胞、血管周皮細胞、血管内皮細胞、骨髄由来細胞、尿細管上皮細胞などさまざまな報告がなされてきた<sup>19,27</sup>。血管内皮細胞、骨髄由来細胞、尿細管上皮細胞については、最近の研究によって筋線維芽細胞への貢献度が非常に低いことがわかってきた<sup>28</sup>。われわれは、筋線維芽細胞の大部分がREP細胞に由来することを報告しているが、間質線維芽細胞と血管周皮細胞はPDGFR $\beta$ やCD73といった細胞マーカー因子の発現をREP細胞と共有しており、局在や形態の特徴も似通っていることから、これらの細胞群は重複した集団であると考えられる<sup>23</sup>。したがって、線維化腎における筋線維芽細胞の大部分は、REP細胞(間質線維芽細胞および血管周皮細胞を含む細胞群)に由来するMF-REP細胞である。

最近、筋線維芽細胞は、その由来だけでなく機能的にも多様性を示す細胞群であることが指摘されている。例えば、髄質内層の筋線維芽細胞はWnt4を発現するが、皮質および髄質外層の筋線維芽細胞はWnt4を発現しない<sup>29</sup>。また、細胞外で線維形成の基質となるコラーゲンIの発現をモニタリングする遺伝子改変マウスを用いた研究から、 $\alpha$ SMA陽性の筋線維芽細胞のなかには、コラーゲンIを産生しない細胞が25%含まれることが明らかとなった<sup>30</sup>。さらに、骨髄由来の筋線維芽細胞は増殖せず、線維化における機能的貢献が低いのに対して、MF-REP細胞は増殖能を有し、コラーゲンIを産生する<sup>22,28</sup>。このことから、線維化腎における多様な筋線維芽細胞のなかでも、ME-REP細胞は腎線維化に大きく関与することが理解できる。

### REP細胞の可塑性

維持透析患者の10%強において、透析導入後にEPO投与が不要になることから、MF-REP細胞は環境改善により本来のEPO産生能を取り戻すのではないかと考えられた<sup>31~33</sup>。そこで、われわれはマウスへのUUO施行後2日目に尿管

結紮を解除する実験を行った。その結果、REP細胞は尿管結紮によって筋線維芽細胞に形質転換し、EPO産生能をいったんは失うものの、結紮解除後にEPO産生能を取り戻し、形態も正常化することがわかった<sup>22</sup>。REP細胞の形質転換には可塑性があることが明らかとなり、腎線維化と腎性貧血を同時に治療しうる可能性が示唆された。

REP細胞の可塑性を規定する分子メカニズムを明らかにするために、マウス腎臓の網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、尿管結紮により動脈硬化および急性相反応シグナルが増強され、脂肪酸代謝シグナルが低下することがわかった。これらの遺伝子発現変化は、尿管結紮解除後に元に戻ることから、腎障害の進行と深く関係することが考えられた<sup>22,23</sup>。最近、慢性腎臓病検体を用いた解析からも炎症シグナルの上昇と脂肪酸代謝シグナルの低下が報告されており<sup>34</sup>、マウス実験で明らかにされた現象が、慢性腎臓病の分子病態を理解するうえで有効であることが再確認された。

MF-REP細胞をセルソーターを用いて単離し、遺伝子発現様式を調べたところ、炎症性サイトカインやケモカインを発現し、微小環境における炎症増悪に積極的に参画していることが判明した<sup>22</sup>。このことは、MF-REP細胞が周囲の細胞に働きかけ、炎症の悪循環を形成していることを意味している(図1)。実際に、MF-REP細胞では、TGF $\beta$ やTNF $\alpha$ などの炎症シグナルによって活性化され、サイトカインやケモカインの遺伝子発現を誘導する転写因子SMAD2/3およびNF $\kappa$ B(p65)が活性化している(図3)<sup>22</sup>。また、腎筋線維芽細胞は、障害を受けた細胞から放出される「ダメージ関連分子パターン(damage-associated molecular patterns : DAMPs)」による刺激を受けて、IL-6やMCP-1を産生することが報告されている<sup>35</sup>。そこで、炎症シグナルへの介入による治療効果を検討するために、マウスへの尿管結紮解除後にステロイド(デキサメタゾン)投与を試みたところ、期待通りにREP細胞の機能回復が促進された<sup>22</sup>。以上の結果から、腎障害によって腎内微小環境に生じた炎症シグナルは、REP細胞の形質転換を誘発し、EPO産生低下と炎症の進展を促すことがわかった。また、炎症シグナルへの介入により、REP細胞の機能保護や再生促進につながる治療が可能であることを意味している。

細胞が形質転換する際には、DNAのメチル化修飾などのエピゲノム制御系が重要な役割を果たすと考えられている。実際に、腎線維化ではTGF $\beta$ がDNAメチル基転移酵素1(DNMT1)の発現を誘導し、病的線維化を持続させることがDNMT1欠失マウスの解析から示された<sup>36</sup>。また、わ

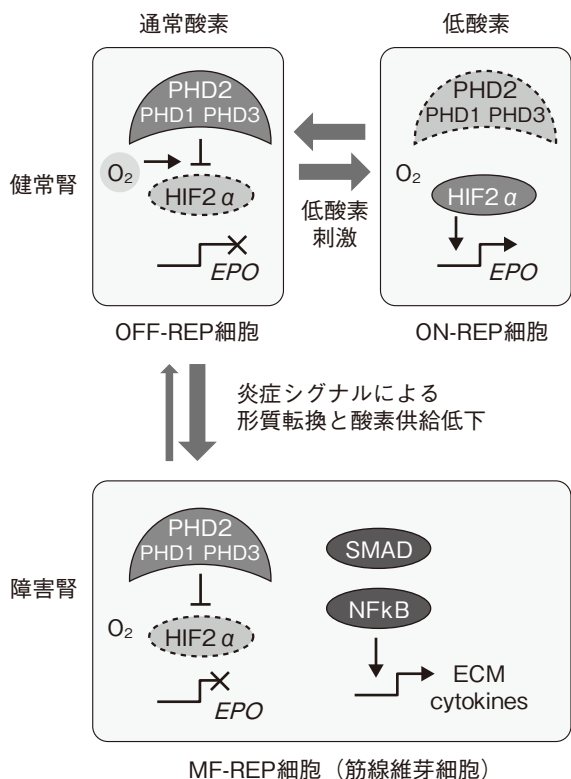


図3 REP細胞におけるEPO遺伝子制御機構とその破綻のメカニズム

健康腎では、PHD(主にPHD2)-HIF2 $\alpha$ の経路によってEPO遺伝子の低酸素誘導的発現が制御されている。低酸素刺激はPHDを不活性化し、HIF2 $\alpha$ を活性化することにより、EPO遺伝子の転写を誘導する。障害腎では、炎症シグナルなどにより、REP細胞がMF-REP細胞に形質転換する。MF-REP細胞では低酸素状態であるにもかかわらず、PHDを介してHIFが不活性化されており、EPO産生不全に陥る。また、炎症シグナルはMF-REP細胞におけるSMADやNF $\kappa$ Bなどの転写因子を活性化し、細胞外基質(extracellular matrix: ECM)やサイトカイン、ケモカイン(IL-6やMCP-1)の発現を惹起する。したがって、REP細胞のMF-REP細胞への形質転換は、貧血と線維化の原因となる。腎内環境を改善させることにより、MF-REP細胞は正常なREP細胞に回復することが可能である。

われわれは、REP細胞がMF-REP細胞に形質転換する過程において、DNMT1およびDNMT3bの遺伝子発現が上昇することを見出した<sup>22)</sup>。EPOを産生しない細胞株のなかには、EPO遺伝子発現を抑制するために、EPO遺伝子領域のDNAが高度にメチル化されているものがあり<sup>37)</sup>、REP細胞の形質転換過程でもEPO遺伝子のメチル化が生じている可能性が考えられる。今後、REP細胞の機能回復を目的とした治療法の開発に向けて、エピジェネティクスの観点からもREP細胞の可塑性について理解を進める必要がある。

## REP細胞と低酸素応答

他臓器に比べ、腎臓は低酸素状態にあるが、病態環境下では、より重篤な低酸素状態に陥ることが腎臓病の共通増悪機序となる<sup>25)</sup>。細胞への酸素供給が低下すると、転写因子HIFを中心とした低酸素応答システムが起動するが、貧血や低酸素に応答したEPO産生制御系においても、HIFが主要な役割を担っている。そこで、HIFを含む低酸素応答系は腎臓病の新たな治療標的として注目されている<sup>38)</sup>。

平常時には、プロリン水酸化酵素群(prolyl hydroxylase domain enzymes)であるPHD1、PHD2およびPHD3を介してHIFが蛋白質分解されており、活性を持たない。一方、低酸素環境下ではプロリン水酸化酵素群が不活性化されるため、HIFが安定化し、標的遺伝子の転写を誘導する<sup>39)</sup>。そこで、末期腎不全患者へのPHD阻害薬の投与が検討され、期待通りに腎EPO産生を増加させるという結果が得られた<sup>40)</sup>。われわれは、慢性貧血・低酸素状態にあるISAMの解析を通して、腎障害に伴って腎内低酸素が重篤化するものの、HIFの標的遺伝子の多くが著しく発現抑制されることを見出した<sup>17)</sup>。この結果は、腎障害による炎症性線維化環境は、腎内への酸素供給を低下させつつも、HIF活性を抑制することにより病態を増悪化させることを示唆している。

MF-REP細胞におけるEPO産生抑制においても、HIFの不適切な不活性化によってEPO遺伝子発現が抑制されていると考え、遺伝子改変マウスを用いた解析を行った。前述したEPO-Creマウスを用いて、REP細胞特異的にPHD1、PHD2およびPHD3を単独または同時に欠失させたところ、PHD2を欠失したREP細胞は恒常的にEPOを産生することがわかった(図3)。また、腎障害によるREP細胞の形質転換には、プロリン水酸化酵素群欠失の影響が認められなかったが、MF-REP細胞におけるEPO産生の抑制が著しく軽減された<sup>17)</sup>。これらの知見によって、炎症シグナル下におけるPHDを介した不適切なHIF分解がMF-REP細胞におけるEPO産生低下の主要機序であることが理解された(図3)。

## まとめ

REP細胞の形質転換および機能不全が腎線維化と貧血の共通の機序であるということが明らかになった。また、REP細胞の形質転換は可逆的であり、一度喪失した本来の機能(EPO産生能)を回復できることがわかった。さらに、

REP細胞がEPO産生能を失う原因として、炎症シグナルによる低酸素応答系の破綻が主要な機序と考えられた。以上の成果は、腎内微小環境の改善などにより、REP細胞の生理的機能回復を図る治療法の開発につながるものと期待される。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

## 文 献

- Bunn HF. Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013 ; 3 : a011619.
- Suzuki N. Erythropoietin gene expression : developmental-stage specificity, cell-type specificity, and hypoxia inducibility. *Tohoku J Exp Med* 2015 ; 235 : 233-240.
- Suzuki N, Mukai HY, Yamamoto M. *In vivo* regulation of erythropoiesis by chemically inducible dimerization of the erythropoietin receptor intracellular domain. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0119442.
- Suzuki N, Suwabe N, Ohneda O, Obara N, Imagawa S, Pan X, Motohashi H, Yamamoto M. Identification and characterization of 2 types of erythroid progenitors that express GATA-1 at distinct levels. *Blood* 2003 ; 102 : 3575-3583.
- 河北 誠, 宮家隆次. エリスロポエチン物語—純化の歩みと遺伝子クローニングへの道のり—. *臨床血液* 2013 ; 54 : 1615-1624.
- Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1977 ; 252 : 5558-5564.
- Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF, Kawakita M, Shimizu T, Miyake T. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985 ; 313 : 806-810.
- Semenza GL, Neufeldt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 5680-5684.
- Suzuki N, Obara N, Yamamoto M. Use of gene-manipulated mice in the study of erythropoietin gene expression. *Methods Enzymol* 2007 ; 435 : 157-177.
- Obara N, Suzuki N, Kim K, Nagasawa T, Imagawa S, Yamamoto M. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood* 2008 ; 111 : 5223-5232.
- Pan X, Suzuki N, Hirano I, Yamazaki S, Minegishi N, Yamamoto M. Isolation and characterization of renal erythropoietin-producing cells from genetically produced anemia mice. *PLoS One* 2011 ; 6 : e25839.
- Suzuki N, Hirano I, Pan X, Minegishi N, Yamamoto M. Erythropoietin production in neuroepithelial and neural crest cells during primitive erythropoiesis. *Nat Commun* 2013 ; 4 : 2902.
- Asada N, Takase M, Nakamura J, Oguchi A, Asada M, Suzuki N, Yamamura K, Nagoshi N, Shibata S, Rao TN, Fehling HJ, Fukatsu, Minegishi N, Kita T, Kimura T, Okano H, Yamamoto M, Yanagita M. Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice. *J Clin Invest* 2011 ; 121 : 3981-3990.
- Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 1995 ; 83 : 59-67.
- Suzuki N, Obara N, Pan X, Watanabe M, Jishage K, Minegishi N, Yamamoto M. Specific contribution of the erythropoietin gene 3' enhancer to hepatic erythropoiesis after late embryonic stages. *Mol Cell Biol* 2011 ; 31 : 3896-3905.
- 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* 2013 ; 4 : 1950.
- 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* 2015 ; in press
- Quaggin SE, Kapus A. Scar wars : mapping the fate of epithelial-mesenchymal-myofibroblast transition. *Kidney Int* 2011 ; 80 : 41-50.
- Mack M, Yanagita M. Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis. *Kidney Int* 2015 ; 87 : 297-307.
- Friedman SL, Sheppard D, Duffield JS, Violette S. Therapy for fibrotic diseases : nearing the starting line. *Sci Transl Med* 2013 ; 5 : 167sr1.
- Maxwell PH, Osmond MK, Pugh CW, Heryet A, Nicholls LG, Tan CC, Doe BG, Ferguson DJP, Johnson MH, Ratcliffe PJ. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int* 1993 ; 44 : 1149-1162.
- Souma T, Yamazaki S, Moriguchi T, Suzuki N, Hirano I, Pan X, Minegishi N, Abe M, Kiyomoto H, Ito S, Yamamoto M. Plasticity of renal erythropoietin-producing cells governs fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2013 ; 24 : 1599-1616.
- Souma T, Suzuki N, Yamamoto M. Renal erythropoietin-producing cells in health and disease. *Front Physiol* 2015 ; 6 : 167.
- Grgic I, Campanholle G, Bijol V, Wang C, Sabbisetti VS, Ichimura T, Humphreys BD, Bonventre JV. Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2012 ; 82 : 172-183.
- Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury : a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 17-25.
- Inomata S, Itoh M, Imai H, Sato T. Serum levels of erythropoietin as a novel marker reflecting the severity of diabetic nephropathy. *Nephron* 1997 ; 75 : 426-430.
- Boor P, Floege J. The renal (myo-)fibroblast : a heterogeneous group of cells. *Nephrol Dial Transplant* 2012 ; 27 : 3027-3036.
- Lebleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, Kalluri R. Origin and function of myofibroblasts in

- kidney fibrosis. *Nat Med* 2013 ; 19 : 1047–1053.
29. DiRocco DP, Kobayashi A, Taketo MM, McMahon AP, Humphreys BD. Wnt4/ $\beta$ -catenin signaling in medullary kidney myofibroblasts. *J Am Soc Nephrol* 2013 ; 24 : 1399–1412.
30. Lin SL, Kisseleva T, Brenner DA, Duffield JS. Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am J Pathol* 2008 ; 173 : 1617–1627.
31. Takeda A, Toda T, Shinohara S, Mogi Y, Matsui N. Factors contributing to higher hematocrit levels in hemodialysis patients not receiving recombinant human erythropoietin. *Am J Kidney Dis* 2002 ; 40 : 104–109.
32. Kuo CC, Lee CT, Chuang CH, Su Y, Chen JB. Recombinant human erythropoietin independence in chronic hemodialysis patients : clinical features, iron homeostasis and erythropoiesis. *Clin Nephrol* 2005 ; 63 : 92–97.
33. Schwartz DI, Pierratos A, Richardson RM, Fenton SS, Chan CT. Impact of nocturnal home hemodialysis on anemia management in patients with end-stage renal disease. *Clin Nephrol* 2005 ; 63 : 202–208.
34. Kang HM, Ahn SH, Choi P, Ko YA, Han SH, Chinga F, Park AS, Tao J, Sharma K, Pullman J, Bottinger EP, Goldberg IJ, Susztak K. Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nat Med* 2015 ; 21 : 37–46.
35. Campanholle G, Mittelsteadt K, Nakagawa S, Kobayashi A, Lin SL, Gharib SA, Heinecke JW, Hamerman JA, Altemeier WA, Duffield JS. TLR-2/TLR-4 TREM-1 signaling pathway is dispensable in inflammatory myeloid cells during sterile kidney injury. *PLoS One* 2013 ; 8 : e68640.
36. Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, Muller GA, Kalbacher H, Salant DJ, Muller CA, Kalluri R, Zeisberg M. Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med* 2010 ; 16 : 544–550.
37. Yin H, Blanchard KL. DNA methylation represses the expression of the human erythropoietin gene by two different mechanisms. *Blood* 2000 ; 95 : 111–119.
38. Nangaku M, Rosenberger C, Heyman SN, Eckardt KU. Regulation of hypoxia-inducible factor in kidney disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2013 ; 40 : 148–157.
39. Koury MJ, Haase VH. Anaemia in kidney disease : harnessing hypoxia responses for therapy. *Nat Rev Nephrol* 2015 ; 11 : 394–410.
40. Bernhardt WM, Wiesener MS, Scigalla P, Chou J, Schmieder RE, Gunzler V, Eckardt KU. Inhibition of prolyl hydroxylases increases erythropoietin production in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2010 ; 21 : 2151–2156.