

# 内因性 EPO 産生能回復を目指した腎性貧血治療

金子恵一 柳田素子

京都大学医学研究科腎臓内科学講座

key words : 腎線維芽細胞, エリスロポエチン, 腎性貧血

## 要 旨

遺伝子組み換えヒトエリスロポエチン (recombinant human erythropoietin; rhEPO) が開発され腎性貧血治療は著しく改善したが、大規模臨床試験において、高用量の rhEPO が心血管イベントを増加させる可能性が指摘されるなど、腎性貧血治療にはまだ解決すべき問題が存在している。近年、EPO 産生細胞の挙動や EPO 産生制御機構の解明が進められ、内因性 EPO 産生能を回復する治療法の開発が期待されている。

## 1 現在の腎性貧血治療における問題点

腎性貧血は慢性腎臓病 (CKD) 患者の合併症の中で最大の問題の一つである。遺伝子組み換えヒトエリスロポエチン (recombinant human erythropoietin; rhEPO) が開発される以前は、透析患者は重篤な腎性貧血による慢性的な倦怠感に悩まされ、また頻回の輸血が必要であった。1977年に Miyake らは、再生不良性貧血患者の 2.5 トンもの尿から EPO 蛋白の精製に成功した<sup>1)</sup>。その後、EPO 遺伝子がクローニングされ rhEPO の開発へと繋がった。rhEPO によって多くの患者において腎性貧血の改善が得られ、輸血頻度が減少した。また rhEPO は QOL の改善、心機能低下抑制など様々な効果を持つと報告されている。

rhEPO は腎性貧血治療に目覚ましい改善をもたらしたが、まだ解決されていない問題が存在する。

rhEPO の開発により腎性貧血の治療が容易になるに従い、適切な治療目標 Hb 値に関する議論が行われるようになった。貧血は CKD 患者の心血管イベントの強いリスク因子であることから、rhEPO を用いて積極的に Hb 値を改善させることで心血管予後が改善することが期待され、腎性貧血を健常人と同等の Hb 値まで改善させる大規模な臨床試験が行われた。

CREATE 試験では、CKD 患者を対象に、rhEPO 投与による目標 Hb 値を 13.0~15.0 g/dL とする高値群と 10.5~11.5 g/dL とする低値群に設定し心血管イベント発生率を比較したが、有意な差を認めなかった<sup>2)</sup>。CHOIR 試験では、CKD 患者を対象に rhEPO 投与による目標 Hb 値を 13.5 g/dL と 11.3 g/dL の 2 群間に割り付けた臨床試験を行ったが、予想に反して高 Hb 値群で心筋梗塞や脳血管障害などのイベントが増加するという結果が報告された<sup>3)</sup>。Normal Hematocrit study は、透析患者を対象に Ht 値 42% を目標とする高値群と Ht 値 30% を目標とする低値群で比較し、高値群で心血管イベントの増加を認め試験が中止された<sup>4)</sup>。このように保存期から透析期を通じて、腎性貧血患者の Hb 値を正常化する治療には優位性が認められなかった。さらに、CHOIR 試験の二次解析から目標 Hb が達成できず、高用量の rhEPO が投与された患者群で心血管イベントが増加していたことが報告され、国内の観察研究からも高用量の rhEPO を投与しても十分な貧血改善の得られない EPO 低反応性患者

で心血管イベントが増加することが報告されたことから、EPO 低反応性という病態が注目されることとなった<sup>5,6)</sup>。

rhEPO には高血圧や凝固能亢進といった副作用が報告され、過剰な rhEPO 投与が心血管イベント発症リスクを高める可能性も指摘されている。しかし一方で、慢性的な炎症や鉄欠乏、栄養状態などの様々な病態が EPO 低反応性を引き起こすことが知られており、EPO 低反応性を示す状態そのものが心血管リスクを高める可能性も考えられる。現状では、高用量 rhEPO と EPO 低反応性を示す状態のいずれが悪いのかは明確になっていない。

ここまで述べたような腎性貧血治療における問題点をどうすれば解決できるであろうか。一つの解決法として、外部から rhEPO を補充するのではなく、CKD 患者の体内の EPO 産生能を回復させるというアプローチがあげられる。このアプローチは、貧血の重症度に応じた必要十分な EPO 産生を可能にするばかりでなく、rhEPO を投与するよりも生理的な造血をもたらすことが予想され、腎性貧血治療を改善させることが期待される。

これまで EPO 産生能を回復させる治療法の開発が進んでいなかった理由として、EPO 産生細胞の同定が困難であり、健康時と障害時の EPO 産生細胞の挙動が明らかでなかったことがあげられる。この総説では、まず EPO 産生細胞の同定、その性質と障害腎での挙動を述べ、その後、内因性の EPO 産生能を回復させる治療法について概説する。

## 2 EPO 産生細胞の同定

EPO は高地環境や出血などの低酸素刺激に応答して産生され、赤血球造血を促すホルモンである。1950 年代から EPO の主要な産生臓器が腎臓であることが知られていたが、腎臓内のどのような細胞が EPO を分泌しているかは長い間不明であった。免疫組織染色や *in situ* ハイブリゼーション法などの方法を用いた検討が行われたが、それらの結果は一致せず、EPO 産生細胞として糸球体細胞、遠位尿細管細胞、尿細管間質細胞などがあげられ結論は出ていなかった。

2000 年代に、Obara らによって、EPO 産生細胞で緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する bacterial artificial chromosome (BAC) 遺伝子組み換えマウスが作

成された<sup>7)</sup>。この BAC には EPO 遺伝子周囲 180 kb の広範な制御領域が含まれている。このマウスによって腎臓の EPO 産生細胞を可視化することが可能となり、EPO 産生細胞が腎臓の皮髄境界部に存在し、神経系マーカーを発現する線維芽細胞であり、近位尿細管や血管内皮周囲に接して存在していることが明らかになった。

重篤な貧血下では、正常時と比較して血中 EPO 濃度は 1,000 倍以上に上昇し、腎臓の EPO 産生は貧血や低酸素刺激によって大きく変動することがわかってきた。このマウスを用いた検討で、正常な酸素分圧下では、腎皮質深部および髄質外層に存在するごく少数の細胞が EPO を産生しているにすぎないが、重篤な貧血を誘発し低酸素状態に陥ると、より皮質側に存在する細胞も EPO を産生するようになり、EPO 産生細胞が増加することが示された。この結果から、腎臓での EPO 産生量の制御は、個々の EPO 産生細胞が分泌する EPO の量を調節するのではなく、EPO 産生細胞の数を調節することで行われていると考えられた。障害腎では EPO 産生能が低下し GFP が産生されなくなるため、この遺伝子組み換えマウスでは障害腎で EPO 産生細胞がどうなっているかを追跡することはできず、障害腎での EPO 産生細胞の挙動は不明なままであった。

## 3 末期腎不全患者にも EPO 産生能が残存

日本や海外での横断研究により、クレアチニンクリアランス 60 mL/min 以下より腎機能低下とともに平均 Hb 値が低下することが報告され、CKD の進行とともに生理的な EPO 産生能が損なわれ腎性貧血を発症することがわかっている<sup>8,9)</sup>。

いくつかの疫学研究からは、末期腎不全 (ESRD) 患者においても、EPO 産生能が残存していることが示唆される。例えば、透析患者で血圧コントロールの目的で両側腎臓を切除したところ、腎性貧血が悪化したという報告があり、これは透析患者の腎臓でも EPO 産生がなされていることを示している<sup>10)</sup>。また Brookhart らは、居住地域の標高と透析患者の貧血と rhEPO 投与量の関係を検討し、より高地に住む透析患者では貧血が軽度かつ rhEPO 投与量が少ないことを報告した<sup>11)</sup>。この報告からは、高地環境の低酸素刺激が透析患者の EPO 産生を活性化したと考えられ、

透析患者でも低酸素刺激による EPO 産生能の調節機序が残存していることが示唆される。これらの疫学研究から、腎機能が廃絶したと思われていた ESRD 患者であっても、造血を維持するには不十分ながらも EPO 産生能が残存している可能性が高いと考えられ、障害腎での EPO 産生細胞の挙動の解明が注目された。

#### 4 腎線維化と腎性貧血, EPO 産生細胞の可塑性

CKD で EPO 産生能が低下する機序について, EPO 産生細胞が死滅する可能性と, EPO 産生細胞は存在するが機能不全に陥っている可能性が考えられるが, いずれであるかは明らかにされていなかった。

腎線維化は CKD で共通して見られる病態であり, 障害された糸球体や尿管が結合組織で置き換えられ腎間質が著しく拡張した状態である。腎線維化は健康な腎臓には存在しない  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) 陽性 myofibroblast がコラーゲン線維や細胞外マトリックスを過剰に産生することにより引き起こされるが, この  $\alpha$ SMA 陽性 myofibroblast の由来については様々な説が提唱され, 議論がなされてきた。具体的には,

- ① 尿管上皮細胞が形質転換して間質に移入し  $\alpha$ SMA 陽性 myofibroblast になるという epithelial mesenchymal transition (EMT) 説
- ② コラーゲンを発現する血球由来の fibrocyte が組織に遊走し  $\alpha$ SMA 陽性 myofibroblast に形質転換するという説
- ③ 健康な腎間質に存在する腎線維芽細胞が  $\alpha$ SMA 陽性 myofibroblast に形質転換するという説

などである。

Obara らによって, 腎における EPO 産生細胞が同

定された後も, EPO 産生細胞の発生学的起源はわかっていなかった。1974 年, Le Douarin らは, ウズラの神経管をニワトリに移植するウズラ・ニワトリ交換移植実験を行い, ウズラの神経堤由来の細胞がニワトリの腎臓の間質に存在することを報告した<sup>12)</sup>。神経堤細胞は神経管から発生し, 胎生期に様々な臓器に遊走し, 平滑筋細胞や神経細胞など多種類の細胞に分化する。

我々は腎臓の EPO 産生細胞が腎臓の間質に存在し, 神経系マーカーを発現することから, EPO 産生細胞が神経堤由来ではないかと考え, 神経堤と末梢神経のミエリンで発現する protein 0 (P0)-Cre マウスを用いて神経堤由来細胞を永久標識し, 細胞系譜追跡実験を行った。その結果, 腎臓の皮質および髄質外層の線維芽細胞の約 98% が P0-Cre で標識される細胞 (P0 細胞) であり, その一部が EPO 産生細胞であることを証明した<sup>13)</sup>。さらに同マウスに線維化モデルを惹起したところ, P0 細胞が著明に増加し  $\alpha$ SMA 陽性 myofibroblast のほとんどが P0 細胞であることが明らかになった。また EPO 産生細胞も  $\alpha$ SMA 陽性 myofibroblast に形質転換し, その過程で EPO 産生能を失うことを示した。これらの結果により, 腎臓の線維化の原因となる  $\alpha$ SMA 陽性 myofibroblast の由来が元々腎臓に存在していた線維芽細胞であること, また腎性貧血が線維芽細胞の機能障害によって生じることが示された。

さらに我々は, EPO 産生細胞が  $\alpha$ SMA 陽性 myofibroblast へ形質転換した後も, 貧血惹起や選択的エストロゲン受容体調節薬 (SERM) 投与などにより EPO 産生能が回復可能であることも見出した (図 1)。貧血惹起によって EPO 産生能が回復可能であるという結果は, 透析患者においても低酸素を感知して EPO を分泌する生理的なフィードバック機構が残存してい

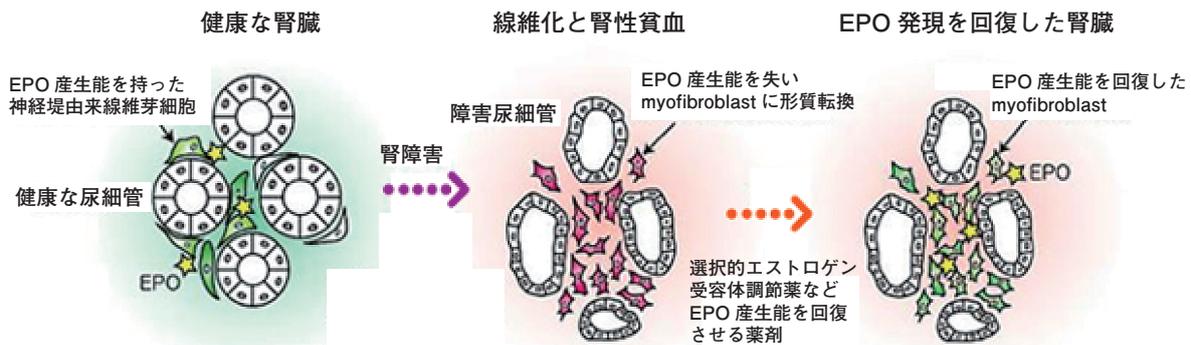


図 1 線維芽細胞の形質転換によって生じる腎性貧血

ることを示した疫学研究ともよく符合する。

EPO 遺伝子欠損マウスは胎生 13 日頃に重度の貧血を呈し死亡する。Yamazaki らは、胎生期には肝臓で EPO が産生され造血が行われていることに着目し、腎臓では EPO 発現を欠損するが肝臓での EPO 発現は保たれている遺伝子組み換えマウスを作成した。このマウスは胎生致死を回避し、成長すると赤血球量が正常の 1/3 程度という重度の EPO 欠乏性貧血を呈し inherited super-anemic mice (ISAM) と命名された<sup>14,15)</sup>。ISAM の EPO 遺伝子座には GFP が挿入されており、EPO 産生細胞では GFP が発現する。したがって、ISAM では GFP で可視化することで EPO 産生細胞を効率よく検出し、また EPO 産生能を EPO-GFP mRNA 発現レベルによって検討することが可能である。

ISAM に対して一側尿管結紮 (UUO) により腎線維化を誘導したところ、重篤な貧血下にもかかわらず EPO 産生能が著減し、UUO 2 日目には EPO 産生細胞の多くが  $\alpha$ SMA 陽性 myofibroblast に形質転換していた。これらのことから、 $\alpha$ SMA 陽性 myofibroblast に形質転換した EPO 産生細胞は EPO 産生能を喪失することが明らかになった。また EPO 遺伝子発現の経験のある細胞を永続的に標識することができる EPO-Cre マウスと ISAM を交配したマウスの検討から、腎皮質および髄質外層のほとんどの線維芽細胞が潜在的に EPO 産生能を有すること、線維化時の  $\alpha$ SMA 陽性 myofibroblast のほとんどが EPO 発現経験細胞由来であることが示された。そして重篤な貧血下にもかかわらず、これらの細胞は EPO-GFP を発現していなかった。これらの結果から、EPO 発現経験細胞が皮質お

よび髄質外層の  $\alpha$ SMA 陽性 myofibroblast の主な由来であること、線維化腎で生じる腎性貧血では EPO 産生細胞が死滅しているのではなく機能不全に陥っていることがさらに検証された。

$\alpha$ SMA 陽性線維芽細胞に形質転換し、EPO 産生能を失った EPO 産生細胞が回復能を有するかどうかは腎性貧血の新しい治療戦略を考えるうえで重要なポイントである。ISAM に UUO による線維化を誘導した後に尿管閉塞を解除したところ、EPO 産生細胞は  $\alpha$ SMA 陽性 myofibroblast から正常な線維芽細胞へと回復し、EPO 産生能を取り戻すことが示された。この結果から EPO 産生細胞が高い可塑性をもった細胞であり、低下した EPO 産生能は適切な介入によって回復可能であると考えられた。

## 5 CKD における EPO 産生能低下の機序

これまでに述べたように、腎性貧血の原因が EPO 産生細胞の消失ではなく機能不全であることが明らかになってきた。EPO 産生は転写因子 hypoxia-inducible factor (HIF) 依存性に低酸素刺激によって亢進するように制御されている。こうした低酸素刺激に対する応答は、CKD に伴う様々な要因によって損なわれることが示されている (図 2)。

### 5-1 線維化に伴う環境変化

腎臓の慢性虚血や慢性炎症が腎線維化の要因となることが知られている。エネルギー代謝異常や虚血などは酸化ストレスを悪化させ、さらなる慢性炎症を惹起し線維化を進行させる。Souma らは ISAM を用いた検討により、myofibroblast に形質転換した EPO 産生

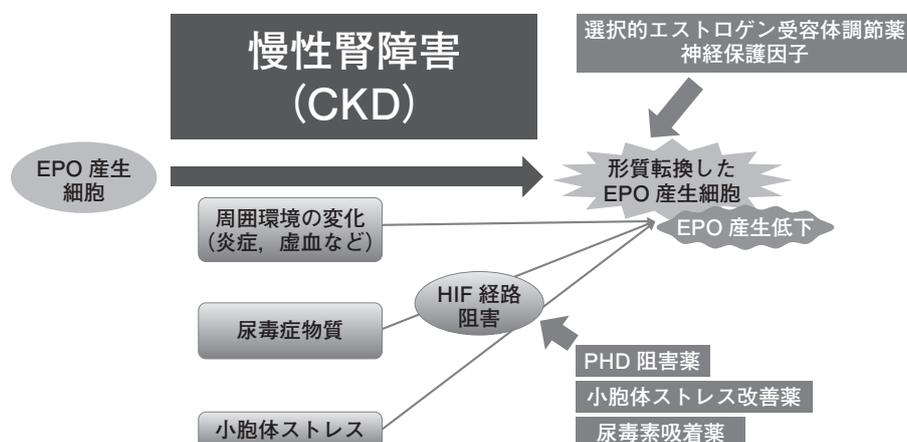


図 2 腎性貧血の発症・進展機序と新規腎性貧血治療薬の開発

細胞が炎症性サイトカインを発現し周囲の炎症増悪に関与していることを見出し、UO 解除後にグルココルチコイドを投与することによって、EPO 産生能の回復が促進されることを示した<sup>15)</sup>。腎線維化に伴う慢性炎症などの周囲環境の変化が EPO 産生能を低下させていることが示唆される。

## 5-2 尿毒素

インドキシル硫酸は尿毒症を引き起こす代表的な原因物質の一つである。インドキシル硫酸は尿毒症を引き起こす以外に、尿細管細胞を障害することで腎障害を進行させることが示されている。

Chiang らによって、インドキシル硫酸は EPO 産生細胞に直接作用し EPO 産生を低下させる作用を持つことが報告された<sup>16)</sup>。インドキシル硫酸は、低酸素刺激による HIF 活性化を抑制し低酸素応答を阻害することで EPO 産生を低下させる。尿毒症物質自体に EPO 産生細胞障害作用があると考えられることから、尿毒素吸着薬が腎性貧血治療に有効である可能性が考えられる。

## 5-3 小胞体ストレス

近年、腎臓病や心血管疾患、糖尿病において、小胞体ストレスが重要な役割を果たしていることが報告されている。小胞体は蛋白の折り畳みや糖鎖修飾を行い、蛋白の高次構造を形成する機能を持つ細胞内小器官である。小胞体ストレスとは、正常に折り畳まれなかった蛋白が小胞体に蓄積した状態を指す。小胞体ストレスは細胞に障害を与えるため、細胞にはその障害を回避するシステムが存在し小胞体ストレス応答 (unfolded protein response; UPR) と呼ばれる。UPR 自体は細胞恒常性維持を目的とした生理的な反応であるが、過剰な UPR は障害を悪化させる。

Chiang らは、小胞体ストレスを惹起することで EPO 産生が低下し、小胞体ストレス改善薬によって EPO 産生が改善することを報告した<sup>17)</sup>。小胞体ストレスは HIF による EPO 遺伝子の発現亢進を抑制し EPO 産生を低下させる一方で、EPO 遺伝子と同様に HIF によって調節される VEGF 遺伝子発現は逆に亢進させる。このことから、HIF 経路と UPR 経路の間に複雑な相互作用が存在することが考えられる。HIF 経路と UPR 経路の相互作用は新しい EPO 産生調節機

構であり、これに基づいた腎性貧血治療法が存在する可能性を示唆している。

## 6 内因性 EPO 産生能の回復

始めに述べたように、現在の rhEPO による治療には様々な問題点を抱えており、EPO 産生細胞の機能を回復し内因性の EPO 産生を改善させる治療法の開発が望まれている。現在研究が進んでいる薬剤としては、EPO の転写因子である HIF の分解に関わる酵素であるプロリン脱水素酵素 (proline hydroxylase; PHD) をターゲットとした治療法、そして EPO 産生細胞が神経細胞の性質を持つことから、神経保護因子に着目した治療薬やエストロゲン受容体調節薬の可能性が検討されている。また EPO 低反応性を調節する薬剤や小胞体ストレス改善薬なども研究が進められている。

### 6-1 PHD 阻害薬

EPO 遺伝子調節には HIF が重要な役割を果たしている。HIF は低酸素に陥った細胞内で誘導される転写因子であり、血管新生や赤血球造血、解糖系の遺伝子制御に作用し、低酸素ストレス応答に重要な働きをしている。HIF は  $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットから構成され、 $\alpha$  サブユニットはプロリン水酸化酵素 (proline hydroxylase; PHD) によって水酸化され、その後 von Hippel Lindau 蛋白によりユビキチン化され分解される。すなわち、PHD は HIF を分解し EPO 産生を抑制するが、低酸素状態では PHD 活性が低下するため、HIF が増加し EPO 産生を誘導する。

PHD 阻害薬は HIF の安定化を通じて EPO 産生を増加させることが期待された。Bernhardt らは、PHD 阻害薬を透析患者に投与したところ、血中 EPO 濃度が約 30 倍に上昇することを報告し、末期腎不全患者の腎臓からでも EPO 産生を活性化することが可能であることを示した<sup>18)</sup>。PHD 阻害薬は新たな腎性貧血の治療薬として注目され、現在も国内外で治験が進行している。しかし、HIF は EPO 遺伝子以外にも VEGF など 300 以上の遺伝子を調節していることから、HIF の活性化によって様々な副作用が生じる可能性があり、今後の臨床データの蓄積が必要である。

## 6-2 選択的エストロゲン受容体調節薬

女性は男性と比較して糖尿病性腎症の進行が遅いことが報告され、その性差を引き起こす原因としてエストロゲンが想定されていた。動物実験において、エストロゲンや選択的エストロゲン受容体調節薬 (SERM) は腎障害に対して保護的に働くと報告されている。前項で述べたように、我々は SERM 投与によって myofibroblast に形質転換した EPO 産生細胞から EPO 産生能を回復できることを報告している<sup>13)</sup>。SERM は HIF 経路とは異なる経路を介した新規腎性貧血治療薬候補である。

## 6-3 神経保護因子

我々は神経保護因子であるグルココルチコイドや neurotrophin によって myofibroblast における EPO 産生能が回復することを見出した<sup>13)</sup>。グルココルチコイドは ISAM を用いた検討においても EPO 産生能回復効果を示し、貧血治療薬として有望である<sup>15)</sup>。ただし、グルココルチコイドは長期間の使用で多くの臓器に副作用を引き起こすことが知られており、治療期間が長期間に及ぶ腎性貧血の治療薬として使用するまでに解決しなければならない問題が残っている。

## 6-4 その他の治療戦略

先項で述べたように、EPO 産生低下に小胞体ストレスが関与しており、小胞体ストレス改善薬によって EPO 産生低下が改善することができると報告された<sup>17)</sup>。小胞体ストレスと腎障害進行の関連を示す報告が増えており、小胞体ストレス改善薬は EPO 産生細胞の機能改善をもたらす CKD 進行を抑制することが期待される<sup>19)</sup>。

先に述べたように、CHOIR 試験などのサブ解析によって、高用量 rhEPO が投与された EPO 低反応性患者において、心血管イベント発症が増加したと報告された。EPO 低反応性を改善させることも重要な治療戦略である。慢性炎症や鉄代謝異常が EPO 低反応性と関連していることが考えられ、これらに介入する薬剤が有用である可能性が高いと推測される。

再生医療の分野にも進展が見られている。Yokoo らは、ヒト間葉系細胞を異種胎内へ移植することで腎臓様臓器を樹立することに成功した。この neo-kidney には EPO 産生細胞が含まれ、貧血惹起に反応して

EPO 産生を増加するという生理的応答を示すことが確認された<sup>20)</sup>。iPS 細胞を用いた EPO 産生細胞の作成も進められており、今後も注目を集める分野である。

## おわりに

rhEPO の発明は腎性貧血の治療に目覚ましい改善をもたらす、CKD 患者の QOL を改善させ、感染リスクの伴う輸血を激減させた。しかしながら、最近になって、高用量の rhEPO 治療に伴う危険性が指摘され、新たな治療法の開発が望まれている。EPO 産生細胞に関する基礎研究は近年著しく進展を認め、腎性貧血の新しい治療法の開発が期待され、我々もそれを目指し日々の研究に精進している。

## 文 献

- 1) Miyake T, Kung CK, Goldwasser E : Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem*, 252(15); 5558-5564, 1977.
- 2) Drüeke TB, Locatelli F, Clyne N, et al. : Normalization of hemoglobin level in patients with chronic kidney disease and anemia. *N Engl J Med*, 355(20); 2071-2084, 2006.
- 3) Singh AK, Szczech L, Tang KL, et al. : Correction of Anemia with Epoetin Alfa in Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med*, 355(20); 2085-2098, 2006.
- 4) Besarab A, Bolton WK, Browne JK, et al. : The Effects of Normal as Compared with Low Hematocrit Values in Patients with Cardiac Disease Who Are Receiving Hemodialysis and Epoetin. *N Engl J Med*, 339(9); 584-590, 1998.
- 5) Szczech LA, Barnhart HX, Inrig JK, et al. : Secondary analysis of the CHOIR trial epoetin-[alpha] dose and achieved hemoglobin outcomes. *Kidney Int*, 74(6); 791-798, 2008.
- 6) Fukuma S, Yamaguchi T, Hashimoto S, et al. : Erythropoiesis-Stimulating Agent Responsiveness and Mortality in Hemodialysis Patients: Results from a Cohort Study From the Dialysis Registry in Japan. *American Journal of Kidney Diseases*, 59(1); 108-116, 2012.
- 7) Obara N, Suzuki N, Kim K, et al. : Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood*, 111(10); 5223-5232, 2008.
- 8) Kohagura K, Tomiyama N, Kinjo K, et al. : Prevalence of anemia according to stage of chronic kidney disease in a large screening cohort of Japanese. *Clin Exp Nephrol*, 13(6); 614-620, 2009.
- 9) Hsu C-Y, Bates DW, Kuperman GJ, et al. : Relationship between hematocrit and renal function in men and women. *Kidney Int*, 59(2); 725-731, 2001.
- 10) Kominami N, Lowrie EG, Ianhez LE, et al. : the Effect of Total Nephrectomy on Hematopoiesis in patients undergoing

- chronic hemodialysis. *J Lab Clin Med*, 78(4); 524-532, 1971.
- 11) Brookhart MA, Schneeweiss S, Avorn J, et al. : The Effect of Altitude on Dosing and Response to Erythropoietin in ESRD. *J Am Soc Nephrol*, 19(7); 1389-1395, 2008.
  - 12) Le Douarin NM, Teillet M-AM : Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neurectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique. *Developmental Biology*, 41(1); 162-184, 1974.
  - 13) Asada N, Takase M, Nakamura J, et al. : Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice. *J Clin Invest*, 121; 3981-3990, 2011.
  - 14) Yamazaki S, Souma T, Hirano I, et al. : A mouse model of adult-onset anaemia due to erythropoietin deficiency. *Nat Comms*, 4; 1950, 2013.
  - 15) Souma T, Yamazaki S, Moriguchi T, et al. : Plasticity of Renal Erythropoietin-Producing Cells Governs Fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 24(10); 1599-1616, 2013.
  - 16) Chiang C-K, Tanaka T, Inagi R, et al. : Indoxyl sulfate, a representative uremic toxin, suppresses erythropoietin production in a HIF-dependent manner. *Lab Invest*, 91(11); 1564-1571, 2010.
  - 17) Chiang C-K, Nangaku M, Tanaka T, et al. : Endoplasmic reticulum stress signal impairs erythropoietin production: a role for ATF4. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 304(4); C342-C353, 2013.
  - 18) Bernhardt WM, Wiesener MS, Scigalla P, et al. : Inhibition of prolyl hydroxylases increases erythropoietin production in ESRD. *J Am Soc Nephrol*, 21(12); 2151-2156, 2010.
  - 19) Inagi R : Endoplasmic reticulum stress as a progression factor for kidney injury. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(2); 156-165, 2010.
  - 20) Yokoo T, Fukui A, Matsumoto K, et al. : Generation of a Transplantable Erythropoietin-Producer Derived From Human Mesenchymal Stem Cells. *Transplantation*, 85(11); 1654-1658, 2008.