

平成 2 1 年 4 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390228

研究課題名（和文） 腎臓における低酸素応答経路の網羅的機能解析とその治療応用

研究課題名（英文） Comprehensive functional analysis and application of responses against hypoxia in the kidney

研究代表者

南学 正臣（NANGAKU MASAOMI）

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号 90311620

研究成果の概要：

低酸素状態において代償性の血管新生を司るVEGFの新たな調節因子として、MAP3K6が働いていることを、siRNA libraryをスクリーニングすることによって見出した。血管新生のアッセイや、MAP3K6をノックダウンした癌細胞株の移植実験により、MAP3K6によるVEGFの発現調節が生理的に重要であることを証明した。

並行して、慢性低酸素腎の網羅的遺伝子発現解析を行い、metallothioneinの新しい低酸素に対する防御機構を示した。同様の解析により、低酸素腎において腎臓に内因性にヘモグロビンが発現しており抗酸化能を持っていること、一方 Cu/Zn SOD の発現は減少しておりこれがTNF- α によることも見出し、腎臓の低酸素病態を理解するための知見を蓄積した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：虚血、慢性腎臓病、低酸素、血管新生、腫瘍、HIF、腎不全

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病進行の共通メカニズムとして、病理学的解析から尿細管間質障害の重要性が再認識されてきた。この尿細管間質障害を引き起こす機序として、蛋白尿以外に「慢性低酸素による尿細管間質障害」が、あらゆる慢性腎臓病でその進行を説明できる統一的な機序として注目を集め始めていた。このような観点から慢性腎不全進行の機序を解明し、それに対する治療法を確立することは学

問的に最重要であり、また多数の腎不全患者に対して共通の利益をもたらすものとして社会的影響も計り知れないと考えられた。

2. 研究の目的

腎臓における低酸素状態でのシグナル伝達に関連する新規分子を明らかにすることによって、新しい観点から慢性低酸素による腎機能低下の進展メカニズムを解明する。ま

た、この研究により慢性低酸素による腎障害に関連する新しい分子標的を見出すとともに、それを利用して将来的に合理的かつ革新的腎不全治療法を確立につなげる。

3. 研究の方法

siRNA library のスクリーニングによって機能的に重要な低酸素応答関連分子を同定・解析する。スクリーニングには、低酸素に応答する代表的生体防御分子である VEGF の native promoter の下流に luciferase を組み込んだベクターを用いる。また、慢性低酸素腎の網羅的遺伝子発現解析をすることにより、低酸素腎における病態生理を明らかにする。以上の研究で見いだされた分子について、様々な手法において病態における分子の発現量の変動を調べるとともに、高発現およびノックダウンの実験によりその機能的意義を解析する。

4. 研究成果

siRNA library をスクリーニングすることによって見出したMAP3K6 は、Matrigel にて血管内皮細胞を培養する血管新生のアクセイヤ、MAP3K6 をノックダウンした癌細胞株の移植実験により、生理的に重要な VEGF 調節因子であることが分かった。

慢性低酸素腎の網羅的遺伝子発現解析により見出した metallothionein (MT) は、従来より重金属のキレートと抗酸化能を持つ分子であることが知られていたが、我々の研究により MT それ自身が ERK/mTOR pathway を介して HIF を活性化する新しい機能を持つことが示された。更に、低酸素腎において腎臓に内因性にヘモグロビン (Hb) が発現しており抗酸化能を持っていること、一方 Cu/Zn SOD の発現は減少しておりこれが TNF- α によることも見出した。腎臓における内因性の Hb の発現は予想外の知見であり、ネフロンの各 segment の microdissection、組織からの laser capture microdissection、insitu hybridization などの様々な手法で確認を行うとともに、培養細胞における α -globin と β -globin の同時高発現実験によりこの Hb が抗酸化能を持つことを示した。また、TNF- α に対する中和抗体を持ちいた実験で、慢性低酸素腎で Cu/Zn SOD の発現量が回復するとともに、腎障害も軽減することを確認した。MT と Hb の論文は、それぞれの雑誌に editorial comment 付で掲載され、これらの仕事は Nature publisher の A-IBMN HIGHLIGHTS にも取り上げられるなど、国際的にも大変注目されている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計16件、査読有)

1. Kumagai T, Nangaku M, Kojima I, Nagai R, Ingelfinger JR, Miyata T, Fujita T, Inagi R: Glyoxalase I overexpression ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol Renal Physiol in press*
2. Eto N, Miyagishi Y, Inagi R, Fujita T, Nangaku M: Suppression of MAP3 kinase 6 mediates anti-angiogenic and tumor-suppressive effects via VEGF repression. *Am J Pathol in press*
3. Kojima I, Tanaka T, Inagi R, Nishi H, Aburatani H, Kato H, Miyata T, Fujita T, Nangaku M: Metallothionein is up-regulated by hypoxia and stabilizes HIF in the kidney. *Kidney Int* 75, 268-277, 2009
4. Nishi H, Inagi R, Kato H, Tanemoto M, Kojima I, Son D, Fujita T, Nangaku M: Hemoglobin is expressed as anti-oxidant factor by mesangial cell. *J Am Soc Nephrol* 19, 1500-1508, 2008
5. Inagi R, Kumagai T, Miyata T, Fujita T, Nangaku M: Preconditioning of endoplasmic reticulum (ER) stress ameliorated anti-Thy1 glomerulonephritis of rats. *J Am Soc Nephrol* 19, 915-922, 2008.
6. Son D, Kojima I, Inagi R, Matsumoto M, Fujita T, Nangaku M: Chronic hypoxia aggravates renal injury via suppression of Cu/Zn-SOD - a proteomic analysis. *Am J Physiol Renal Physiol* 294, F62-72, 2008.
7. Katavetin P, Inagi R, Miyata T, Tanaka T, Sassa R, Ingelfinger JR, Fujita T, Nangaku M: Albumin suppresses vascular endothelial growth factor via alteration of hypoxia-inducible factor / hypoxia-responsive element pathway. *Biochem Biophys Res Commun*

- 367, 305-310, 2008.
8. Nangaku M, Inagi R, Miyata T, Fujita T: HIF and renal disease. **Nephron Exp Nephrol** 110, e1-7, 2008
 9. Nangaku M, Fujita T: Activation of the renin-angiotensin system and chronic hypoxia of the kidney. **Hypertens Res** 31, 175-184, 2008
 10. Nangaku M, Nishi H, Miyata T: The role of chronic hypoxia in kidney disease. **Chin Med J** 121, 257-264, 2008.
 11. Nangaku M, Izuhara Y, Takizawa S, Yamashita T, Fujii-Kuriyama Y, Ohneda O, Yamamoto M, van Ypersele de Strihou C, Miyata T: A novel class of prolyl hydroxylase inhibitors induces angiogenesis and exerts organ protection against ischemia. **Arterio Thromb Vasc Biol** 27, 2548-2554, 2007
 12. Kojima I, Tanaka T, Inagi R, Kato H, Yamashita T, Sakiyama A, Ohneda O, Takeda N, Sata M, Miyata T, Fujita T, Nangaku M: Protective role of HIF-2 α against ischemic damage and oxidative stress in the kidney. **J Am Soc Nephrol** 18, 1218-1226, 2007
 13. Eto N, Wada T, Inagi R, Takano H, Shimizu A, Kato H, Kurihara H, Kawachi H, Shankland SJ, Fujita T, Nangaku M: Darbepoetin protects podocytes by preservation of the cytoskeleton and nephrin distribution. **Kidney Int** 72, 455-463, 2007
 14. Katavetin P, Inagi R, Miyata T, Sassa R, Adler S, Eto N, Kato H, Fujita T, Nangaku M: Erythropoietin induces heme oxygenase-1 expression and attenuates oxidative stress. **Biochem Biophys Res Commun** 359, 928-934, 2007
 15. Shao J, Nangaku M, Inagi R, Kato H, Miyata T, Matsusaka T, Noiri E, Fujita T: Receptor-independent intracellular radical scavenging activity of an angiotensin II receptor blocker. **J Hypertens** 25, 1643-1649, 2007
 16. Nangaku M, Eckardt KU: Hypoxia and the HIF system in kidney disease. **J Mol Med** 85, 1325-1330, 2007.
- [学会発表](計16件)
1. Nishi et al. Transgenic Overexpression of Cytochrome Improves the Kidney Ischemia/Reperfusion Injury Via Amelioration of Oxidative Stress. American Society of Nephrology. November 6-8, 2008. Philadelphia, USA
 2. Kawakami et al. Endoplasmic Reticulum Stress Induces Autophagy in Renal Proximal Tubular Cells. American Society of Nephrology. November 6-8, 2008. Philadelphia, USA
 3. Inagi et al. Glyoxalase I Relieves Endoplasmic Reticulum Stress Induced by Hypoxia. American Society of Nephrology. November 6-8, 2008. Philadelphia, USA
 4. Kojima et al. Microarray Analysis of Chronic Hypoxic Kidney Revealed Activation of HIF by Metallothionein. American Society of Nephrology. November 6-8, 2008. Philadelphia, USA
 5. Kumagai et al. Glyoxalase I overexpression lowers hypoxia-induced oxidative stress and ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in the rat. International Society of Oxygen Transport to Tissues. August 4, 2008. Sapporo, Japan
 6. Inagi et al. Preconditioning with endoplasmic reticulum stress ameliorates anti-Thy1 glomerulonephritis in rats. Congress of ERA/EDTA. May 11, 2008. Stockholm, Sweden
 7. Kumagai et al. Glyoxalase I overexpression lowers oxidative stress and ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in the rat. Keystone Symposium. January 15-20, 2008. Vancouver, Canada

8. Kojima et al. Microarray analysis of chronic hypoxic kidney revealed activation of HIF by metallothionein. Keystone Symposium. January 15 -20, 2008. Vancouver, Canada
9. Nangaku et al. A novel class of prolyl hydroxylase inhibitors induces angiogenesis and exerts organ protection against ischemia. Keystone Symposium. January 15 -20, 2008. Vancouver, Canada
10. Eto et al. MAP3 kinase 6 mediates VEGF expression and participates in tumorigenesis and angiogenesis. Keystone Symposium. January 15 -20, 2008. Vancouver, Canada
11. Son et al. Chronic hypoxia aggravates renal injury via suppression of Cu/Zn SOD – a proteomic analysis. Keystone Symposium. January 15 -20, 2008. Vancouver, Canada
12. Eto et al. Darbepoetin Ameliorates Urinary Protein Excretion by Preservation of the Cytoskeleton and Nephlin Distribution in the Podocytes. American Society of Nephrology. Oct 31 - Nov 5, 2007. San Francisco, USA
13. Eto et al. Suppression of MAP3 Kinase 6 Mediates Anti-Angiogenic and Tumor-Suppressive Effects Via VEGF Repression. American Society of Nephrology. Oct 31 -Nov 5, 2007. San Francisco, USA
14. Nangaku et al. A Novel Class of Prolyl Hydroxylase Inhibitors Induces Angiogenesis and Exerts Organ Protection Against Ischemia. American Society of Nephrology. Oct 31 -Nov 5, 2007. San Francisco, USA
15. Son et al. Chronic Hypoxia Aggravates Renal Injury Via Suppression of Cu/Zn SOD – A Proteomic Analysis. American Society of Nephrology. Oct 31 - Nov 5, 2007. San Francisco, USA
16. Nishi et al. Cytochrome b5, a Novel Member of the Globin Family, Protects the Kidney Against Oxidative Stress

s under Ischemic Conditions. American Society of Nephrology. Oct 31 - Nov 5, 2007. San Francisco, USA

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南学 正臣 (NANGAKU MASAOMI)
東京大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号：90311620

(2) 研究分担者

稲城 玲子 (INAGI REIKO)
東京大学・医学部附属病院・特任研究員
研究者番号：50232509

和田 健彦 (WADA TAKEHIKO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90447409

花房 規男 (HANAFUSA NORIO)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90396739

(3) 連携研究者

なし

