

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890053
 研究課題名（和文） 心腎連関に果たす低酸素転写調節因子 H I F の糖化修飾異常の役割の
 解明
 研究課題名（英文） A role of dysregulated glycosylation of hypoxia-inducible factors
 in the pathogenesis of cardio-renal syndrome
 研究代表者
 田中 哲洋（TANAKA TETSUHIRO）
 東京大学・保健・健康推進本部・助教
 研究者番号：90508079

研究成果の概要（和文）：本研究では臨床的に広く認知されている心腎連関の事象に対して、低酸素転写因子の糖化修飾異常の観点から分子生物学的検討を行った。慢性腎不全にて蓄積するメチルグリオキサールを候補物質とした検討では、培養細胞の低酸素応答において有意な影響が認められなかった一方、高血糖環境は最大約 20%の低酸素応答の減弱をもたらした。本結果は、心腎連関ならびにメタボリックシンドロームの分子メカニズム解明の手がかりとなりうる重要な知見であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：This study was designed to gain insight into molecular mechanisms in the pathogenesis of the cardio-renal syndrome, from a viewpoint of dysregulated glycosylation of hypoxia-inducible transcription factors. Methylglyoxal (MG) is a highly reactive metabolite and is known to accumulate in chronic kidney disease. In cell culture experiments, MG failed to impact hypoxia response. On the other hand, high glucose dampened cellular hypoxia response by approximately 20%. Results of the present study provide a clue to understanding molecular mechanisms underlying the cardio-renal syndrome as well as the metabolic syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

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：心腎連関、HIF、糖化修飾

1. 研究開始当初の背景

本邦での末期腎不全による血液浄化療法導入患者は、毎月 1000 人を数え、合計で 26 万人を超えようとしている。そのような背景

から腎不全のハイリスク群を早期より特定・対処する試みが全国で普及し、昨年には日本腎臓学会より、慢性腎臓病 (chronic kidney disease, CKD) ガイドが出されている。

本ガイドでは、早期の腎障害を、(1) 慢性腎不全に至る前段階、として位置づけたのみならず、同時に(2) 心臓・大血管病のリスクファクター(心腎連関)として明記された。後者に関しては、従来より慢性腎不全患者に心・血管系合併症が多いという臨床的観察として知られてきたが、この現象を科学的に説明しうる基礎研究面での知見は乏しい。

一方、近年の研究により、多くの腎疾患モデルにおいて、末期腎不全への final common pathway である尿細管間質障害の進行機転に局所の低酸素が強く関与していること(reviewed in Nangaku M. J Am Soc Nephrol 2006)、また、低酸素応答として発現する転写因子 HIF(hypoxia-inducible factor)が急性・慢性進行性腎障害において臓器保護的に作用していること、が明らかとなってきた。

HIFは α 鎖、 β 鎖からなるヘテロ二量体で、全身の臓器において低酸素環境下に幅広く発現し、解糖系酵素、erythropoietinなどの造血因子、vascular endothelial growth factorなどの血管新生因子の発現を亢進させることによって、細胞レベルでの低酸素応答を司っている。腎臓においてもHIFの系の発現・機能は報告されており(Rosenberger C et al. J Am Soc Nephrol 2002)、尿細管上皮にHIF-1 α が、間質・血管内皮にはHIF-2 α が発現している。

上記のようにHIFは慢性進行性腎障害において幅広く発現し、障害保護的に作用しているが、そこで推測される活性は、理論上推測されるものほど高くはない。つまりHIFの発現量と機能的な転写活性の間に関係が認められている。一つの可能性として、慢性腎障害において生体内にてHIFの活性を低下させる因子が発現・蓄積していることが考えられる。この仮説を支持する一例としてラット糖尿病性腎症モデルが挙げられ、本モデルでの個体臓器内のHIF活性(Katavetin P. J Am Soc Nephrol 2006)は、免疫組織学的に検出できるHIFの発現量(Rosenberger C. Kidney Int 2008)ほど高くないことが報告されている。

慢性腎不全の病態を修飾する因子として、糖尿病以外の病態においても異常な糖化修飾が起こることが分かっており、ヒト・動物実験モデル双方において腎不全状態で糖化修飾産物(advanced glycation end products, AGEs)が血中・組織中に蓄積することが報告されている。Methylglyoxalは代謝の過程で産生される極めて細胞毒性の強い副産物で、慢性腎不全状態において生体内に蓄積されること、またリジン、アルギニンの修飾を介してAGEsの形成に関与することが知られている。また最近、アメリカ・ニューヨークのBrownleeらによってHIFのmethylglyoxalによる糖化修飾が報告された(Ceradini DJ

et al. J Biol Chem 2008)。

2. 研究の目的

本研究では、慢性腎障害によって組織および血中に蓄積されたmethylglyoxalが、低酸素障害時に発現したHIFに糖化修飾をもたらす、本来得られるであろう低酸素に対する防御応答を弱めることによって組織障害を増強する、との作業仮説を立て、同仮説に対する細胞生物学的検証を試みた。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

本研究に使用した細胞株(HeLa, A549, HepG2, HK-2, HEK293)は、10%ウシ胎児血清含有DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)を用い、37度、5%CO₂インキュベーターにて培養した。低酸素刺激には2,2'-dipyridyl(DP)を用いた。またmethylglyoxal(MG)はSigma社より購入した。

(2) ベクターコンストラクトの作製

HIF応答性ルシフェラーゼレポーターは既報のものを用いた(Tanaka T et al. Am J Pathol. 2004)。また、erythropoietin遺伝子の3'に内在する低酸素応答領域は、既報(Warnecke C, FASEB J. 2004)に従い標準的な分子生物学的手法にてクローニングを行い、pGL-3ベクターのBamHI-SalI部位に挿入した。クローニングに使用したプライマー配列は、

EPO-E/+ : 5' -GCTGGATCCCACTCTGGCAGCAGT-3' (下線部がBamHI認識配列)、

EPO-E/- : 5' -AATGTCGACACCTTATTGACCAGCGTAGGC-3' (下線部がSalI認識配列)である。

(3) 一過性トランスフェクション

HIFの転写活性測定はHIF応答性ルシフェラーゼ遺伝子の一過性トランスフェクションによって行った。トランスフェクションはカチオニック・リポソーム(lipofectamine 2000, Invitrogen社)を用いて行い、手法は同社提供のプロトコールに従った。

(4) ルシフェラーゼアッセイ

一過性トランスフェクション後の細胞に対して16時間の低酸素、MG(0.1-10 μ M)、および高血糖(30mM)刺激を加えた後に細胞を溶解し、ルミノメーター(Lumat LB 9507, Berthold社製)にてルシフェラーゼ活性を測定した。試薬はluciferase assay reagent(Promega社)を使用した。また、トランスフェクション効率の補正はrenilla luciferase遺伝子活性の測定にて行い、renilla luciferase assay system(Promega社)を使用した。

(5) ウェスタンブロット法

HIF-1 α タンパク発現の定量はウェスタンブロット法にて行った。サンプルは溶解バッファー(7 M urea, 10% glycerol, 10mM

Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5 mmol/liter dithiothreitol, 1mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonylfluoride, Complete Mini EDTA-free)にて調製し、Lowry法(DC protein assay kit, Bio-Rad社製)にて濃度測定を行った。等量のサンプルを還元条件下、8%アクリルアミドゲルにて電気泳動分離し、PVDF膜に転写後、抗HIF-1 α 抗体(Novus社)にて検出を行った。2次抗体はHRP接合抗rabbit IgG抗体を用い、検出にはECL plus試薬(GE healthcare)を使用した。

4. 研究成果

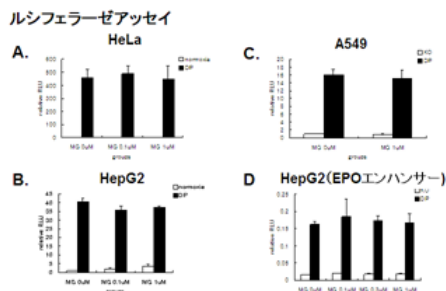
本研究では、臨床的に広く認知されている心腎連関の現象に対し、「慢性腎障害患者にてしばしば認められるタンパクの糖化異常が低酸素応答性転写因子HIF(Hypoxia-Inducible Factor)の機能的減弱をもたらす、低酸素組織障害を増悪させる」という仮説に対して分子生物学的検討を行った。

(1) Methylglyoxal(MG)が低酸素転写応答に及ぼす影響

Methylglyoxal(MG)は代謝の過程で産生される極めて細胞毒性の強い副産物で、慢性腎不全状態において生体内に蓄積され、リジン/アルギニン修飾を介してAGEs(Advanced Glycation End Products)の形成に関与している。そこで本研究ではまずMGを候補物質とし、HIF応答性luciferaseレポーター遺伝子(HRE1uc)の低酸素発現誘導およびHIF- α 鎖の発現に及ぼす影響を調べた(図1および図2)。

本研究にて使用した細胞株において、0.1-1 μ Mの濃度範囲内でMGによるHIF転写活性への影響は認められなかった(図1: A:HeLa, B:HepG2, C:A549)。また、自然発生的なHIF応答性レポーターベクターとしてエリスロポイエチン・エンハンサーをクローニングし、同様にMGの影響を調べたものの、有意な変動は認められなかった(D:HepG2)。

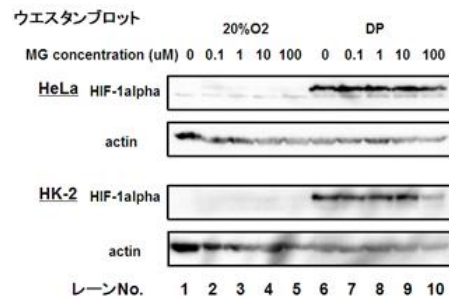
図1. MGがHIF-1の転写活性に及ぼす影響



次にHIF- α タンパク発現量に及ぼすMGの影響を調べた(図2)。調べた2種類の細

胞株において、MGは0.1-10 μ M濃度範囲においてHIF-1 α タンパクの発現量に影響を及ぼさなかった(上段:HeLa, 下段:HK-2)。生体内における蓄積されたMGの濃度は、約0.3-0.5 μ Mとされていることから、生理的条件下においてMGがHIF-1 α タンパク発現、ならびにHIF-1転写活性に影響を及ぼしている可能性は高くないと考えられた。

図2. MGがHIF-1 α タンパクの発現に及ぼす影響

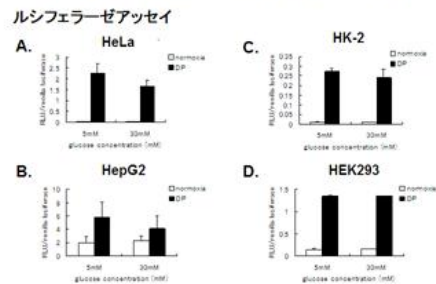


(2) 高血糖環境が低酸素応答転写因子に及ぼす影響

一方で近年、HIFの機能的減弱は高血糖状況下においても観察されることが報告されている。高血糖環境はMGが産生され、機能的役割を果たす場でもあることから、次に高血糖そのものがHIFの発現・機能に果たす影響を検討した(図3および図4)。

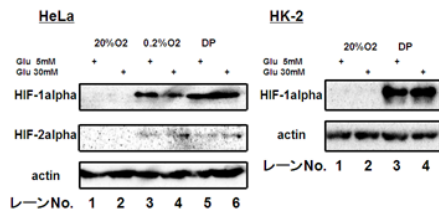
高血糖刺激がHIF応答型レポーター活性に及ぼす影響を複数の細胞株において調べたところ、HeLa細胞において最大20%前後の転写活性の低下をもたらした(A)。HepG2細胞にても同様の傾向を認めた(B)。その一方で、HK-2, HEK293両細胞株においては高血糖によるレポーター活性の変動は認められなかった(CおよびD)。

図3. 高血糖がHIF-1の転写活性に及ぼす影響



次に高血糖環境がHIF-1 α 鎖の発現量に及ぼす影響を、高血糖がHIF転写活性に影響を及ぼす細胞株(HeLa)と、及ぼさない細胞株(HK-2)にて調べた。両細胞株において、HIF-1 α の発現量は高血糖環境による影響を受けなかった(図4)

図4. 高血糖がHIF-1 α タンパクの発現に及ぼす影響
ウエスタンブロット



本結果は細胞に内在する低酸素転写応答のプログラミングが高血糖環境にて修飾を受けている可能性を示唆し、心腎連関ならびにメタボリックシンドロームの分子メカニズム解明の手がかりとなりうる重要な知見であるため、今後詳細な検討が必要であると考えられた。

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1件)

Tanaka T and Nangaku M. The role of hypoxia, increased oxygen consumption and HIF-1 α in progression of chronic kidney disease. Current Opinion in Nephrology and Hypertension. 2010 Jan;19(1):43-50.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 哲洋 (TANAKA TETSUHIRO)
東京大学・保健・健康推進本部・助教
研究者番号：90508079

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号：