

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22790781

研究課題名(和文) 転写因子 HIF-3 が進行性腎疾患の低酸素応答調節に果たす役割の解明

研究課題名(英文) a role of HIF-3 in adjusting cellular hypoxia response and its implications in progressive renal disease

研究代表者

田中 哲洋 (TANAKA, TETSUHIRO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90508079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000 円、(間接経費) 870,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では尿細管低酸素応答調節因子であるHIF-3の発現・機能解析を行った。HIF-3 は低酸素下でHIF-1依存性に発現し、HIF-1標的遺伝子であることが判明した。HIF-3 を培養近位尿細管細胞(HK-2)に過剰発現させると、lysyl oxidase (LOX) の低酸素誘導を最も顕著に抑制した。またHIF-3 は低酸素でのE-カドヘリン消失を抑制し、細胞走化能獲得を阻止した。次に腎線維化モデルでのHIF-3 発現を検討したところ、HIF-3 は尿細管上皮の核に局在していた。以上により、尿細管における低酸素遺伝子発現調節機構は腎線維化を抑制する重要な要因であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated a role of hypoxia-inducible factor (HIF)-3 as a regulator of cellular hypoxia response by HIF-1. HIF-3 α mRNA was transcriptionally up-regulated by hypoxia in a HIF-1-dependent manner. Promoter analysis revealed that HIF-3 α is a novel HIF-1 target gene. Overexpression of HIF-3 α in a human proximal tubular cell line, HK-2, reduced the hypoxic induction of lysyl-oxidase most significantly among other known HIF targets. Functionally, HIF-3 counteracted the disappearance of epithelial markers, such as E-cadherin, by hypoxia and inhibited the acquisition of cell migration. In immunohistochemistry, the expression of HIF-3 α was most evident in the nuclei of tubular epithelial cells in various models of CKD representing fibrosis. In summary, results of the present study clarify the importance of HIF-3 in counteracting kidney fibrosis in the hypoxic environment.

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：HIF-3 進行性腎疾患

1. 研究開始当初の背景

腎尿細管の慢性低酸素が進行性腎障害の共通メカニズムとして注目されている。また、転写因子 hypoxia-inducible factor (HIF)-1 を中心とする低酸素応答は、尿細管障害に対して保護的に働くことが各種実験動物モデルで示されてきた。一方で、HIF-1 の機能を負に制御する因子が報告されつつある。HIF-3 はその代表的候補であるが、その発現・機能には不明な点が多く、腎疾患における機能的役割も未解明である。近年申請者らは HIF-3 に関して、腎尿細管細胞において非常に強い低酸素発現誘導を認めることを報告した。また、マイクロアレイ予備解析において HIF-3 が上皮・間葉形質転換 (EMT) 関連遺伝子の発現を選択的に抑制している可能性を見出している。

2. 研究の目的

本研究では低酸素転写因子 HIF-3 の進行性腎障害における病態意義の解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究ではまず HIF-3 が、HIF-1 による低酸素転写応答を減弱させる因子として機能するかどうかを、HIF 応答型ルシフェラーゼアッセイ、および HIF-1 標的遺伝子の発現プロファイル測定にて検証した。同目的のために、ラット HIF-3 遺伝子を標準的な分子生物学的手法によってクローニングした。ルシフェラーゼアッセイは培養近位尿細管細胞 (HK-2) における一過性トランスフェクション法により行った。HIF-1 標的遺伝子の発現プロファイルは、real-time PCR 法による mRNA 定量、および Western blot 法によるタンパク定量の二法により行った。

培養尿細管細胞における HIF-3 の機能解析を、HIF-3 過剰発現 HK-2 株の樹立により行った。安定過剰発現株は、レトロウイルス法によって樹立し、Western blot 法によって発現確認を行った。通常酸素 (20%) 下と低酸素条件 (1%) 下でコントロール及び HIF-3 過剰発現 HK-2 細胞の細胞増殖、走化・浸潤能、細胞死をそれぞれ細胞数計測、スクラッチアッセイ、MTS アッセイにより評価した。

さらには、内在性 HIF-3 が尿細管細胞の低酸素応答に与える影響を、siRNA による HIF-3 ノックダウン実験にて行った。具体的な実験手法は、上記記載に従った。

尿細管の HIF-3 が腎線維化の重要なステップである epithelial-mesenchymal transition (EMT) に拮抗する可能性を、HIF-3 過剰発現及び HIF-3 ノックダウン実験によって検討した。HIF-3 が低酸素による尿細管 EMT にお

よぼす影響を上記のスクラッチアッセイの他、E-cadherin プロモーター活性、および fibronectin の発現変動によって評価した。

さらに HIF-3 の尿細管発現分布を、EMT が腎線維化に關与する進行性腎障害モデルにおいて免疫組織化学的手法によって検討した。

4. 研究成果

ラット HIF-3 のクローニングと、HIF-1 転写活性への影響

PCR 法によりラット (r)HIF-3 遺伝子をクローニングし、発現ベクターを作製した後、過剰発現系による低酸素応答への影響を調べた。HIF-1 活性を検知する HRE-luciferase ベクターを用いた一過性トランスフェクション、およびルシフェラーゼアッセイを行ったところ、rHIF-3 過剰発現は HIF-1 の転写応答を減弱させることが明らかとなった。本現象は rHIF-3 転写活性化部位 (TAD) 欠損体 rHIF-3 TAD においても観察され、同様に TAD を欠損する mouse IPAS や human HIF-3 4 などの HIF-3 variant において過去に報告されている現象と同一であった。

HIF-3 が腎臓上皮由来細胞の走化能に与える影響

次に、テトラサイクリン誘導性 HIF-3 過剰発現 HEK293 細胞を作製し、その細胞特性を増殖、遊走・分化、細胞死の観点から調べた。HIF-3 の過剰発現は細胞増殖やアポトーシスに影響を与えなかった一方で、scratch assay 法によって低酸素環境における細胞の走化性獲得を有意に抑制することが明らかとなった。そこで、過去に HIF-1 標的遺伝子として報告され、細胞走化能に關与すると考えられた遺伝子群に標的を絞り、その発現プロファイルを可及的網羅的に調べたところ、HIF-3 の過剰発現が lysyl oxidase (LOX) や LOX-like2 (LOXL2) の低酸素発現誘導を選択的かつ最も顕著に抑制することが明らかとなった。

HIF-3 は腎線維化機構としての EMT に拮抗する

HIF-3 の過剰発現は既知の HIF-1 標的遺伝子のうち、lysyl oxidase (LOX) の低酸素誘導を選択的に抑制することと、腫瘍上皮細胞を用いた過去の LOX 機能解析の結果より、LOX は腫瘍の増殖・転移に重要な上皮・間葉形質転換 (EMT) を促進する因子であることから、「尿細管上皮細胞において低酸素依存性に発現する HIF-3 が、腎線維化の一機序と考えられている EMT に拮抗する因子として機能する」との仮説が成り立ち、これを検証した。同目的のため、培養近位尿細管細胞 (HK-2) を使用し、レトロウイルス法による遺伝子導入を用いて HIF-3 過剰発現株を作成した。同

株に対し、低酸素環境下での尿細管上皮マーカーの消失、上皮走化能獲得、および細胞外器質タンパクの発現を調べ、HIF-3 が尿細管細胞の低酸素誘導 EMT に果たす役割を総合的に評価した。HIF-3 過剰発現株において、低酸素による E-カドヘリンの消失はより軽度であり、細胞走化能獲得は抑制され、fibronectin などの細胞外器質発現も軽度となることが確認された。さらにこれらの形質の変化は、siRNA 法による HIF-3 のノックダウン実験系によっても実証された。以上の結果により、尿細管上皮に発現する HIF-3 は、低酸素によってもたらされる EMT に拮抗する因子であると考えられた。

ラット腎線維化モデルにおける HIF-3 発現
最後に、各種腎線維化モデルにおける HIF-3 の発現を免疫組織化学法により検討した。HIF-3 タンパクは片側尿管結紮(UUO)モデルや虚血・再灌流障害長期観察モデルなど、間質の線維化を特徴とする尿細管間質障害モデルにおいて強く発現することが明らかとなった。

以上の研究により、尿細管上皮細胞において、HIF-3 を介する低酸素遺伝子発現の調節機構は腎線維化を抑制する重要な決定因子であることが明らかとなった。

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19件)

1. Shoji K, Tanaka T, Nangaku M. Role of hypoxia in progressive chronic kidney disease and implications for therapy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014 Mar;23(2):161-8.
2. Mimura I, Tanaka T, Nangaku M. Novel therapeutic strategy with hypoxia-inducible factors via reversible epigenetic regulation mechanisms in progressive tubulointerstitial fibrosis. *Semin Nephrol*. 2013 Jul;33(4):375-82.
3. Tanaka T, Yamaguchi J, Higashijima Y, Nangaku M. Indoxyl sulfate signals for rapid mRNA stabilization of Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 2 (CITED2) and suppresses the expression of hypoxia-inducible genes in experimental CKD and uremia. *FASEB J*. 2013 Oct;27(10):4059-75.
4. Higashijima Y, Tanaka T, Nangaku M. Structure-based drug design for hypoxia-inducible factor prolyl-hydroxylase inhibitors and its therapeutic potential for the treatment of erythropoiesis-stimulating agent-resistant anemia: raising expectations for exploratory clinical trials. *Expert Opin Drug Discov*. 2013 Aug;8(8):965-76.
5. Shoji K, Murayama T, Mimura I, Wada T, Kume H, Goto A, Ohse T, Tanaka T, Inagi R, van der Hoorn FA, Manabe I, Homma Y, Fukayama M, Sakurai T, Hasegawa T, Aburatani H, Kodama T, Nangaku M. Sperm-associated antigen 4, a novel hypoxia-inducible factor 1 target, regulates cytokinesis, and its expression correlates with the prognosis of renal cell carcinoma. *Am J Pathol*. 2013 Jun;182(6):2191-203.
6. Chiang CK, Nangaku M, Tanaka T, Iwakaki T, Inagi R. Endoplasmic reticulum stress signal impairs erythropoietin production: a role for ATF4. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013 Feb 15;304(4):C342-53.
7. Tanaka T, Nangaku M. Angiogenesis and hypoxia in the kidney. *Nat Rev Nephrol*. 2013 Apr;9(4):211-22.
8. Tanaka T, Yamaguchi J, Shoji K, Nangaku M. Anthracycline inhibits recruitment of hypoxia-inducible transcription factors and suppresses tumor cell migration and cardiac angiogenic response in the host. *J Biol Chem*. 2012 Oct 12;287(42):34866-82.
9. Muratsu-Ikeda S, Nangaku M, Ikeda Y, Tanaka T, Wada T, Inagi R. Downregulation of miR-205 modulates cell susceptibility to oxidative and endoplasmic reticulum stresses in renal tubular cells. *PLoS One*. 2012;7(7):e41462.
10. Tanaka T, Nangaku M. Recent advances and clinical application of erythropoietin and erythropoiesis-stimulating agents. *Exp Cell Res*. 2012 May 15;318(9):1068-73.
11. Chiang CK, Tanaka T, Nangaku M. Dysregulated oxygen metabolism of the kidney by uremic toxins: review. *J Ren Nutr*. 2012 Jan;22(1):77-80.
12. Chiang CK, Tanaka T, Inagi R, Fujita T, Nangaku M. Indoxyl sulfate, a representative uremic toxin, suppresses erythropoietin production in a HIF-dependent manner. *Lab Invest*. 2011 Nov;91(11):1564-71.
13. Tanaka T, Nangaku M, Nishiyama A. The role of incretins in salt-sensitive hypertension: the potential use of dipeptidyl peptidase-IV inhibitors.

- Curr Opin Nephrol Hypertens. 2011 Sep;20(5):476-81.
14. Mimura I, Tanaka T, Wada Y, Kodama T, Nangaku M. Pathophysiological response to hypoxia - from the molecular mechanisms of malady to drug discovery: epigenetic regulation of the hypoxic response via hypoxia-inducible factor and histone modifying enzymes. J Pharmacol Sci. 2011;115(4):453-8.
 15. Tanaka T, Nangaku M. Pathogenesis of tubular interstitial nephritis. Contrib Nephrol. 2011;169:297-310.
 16. Mimura I, Nangaku M, Nishi H, Inagi R, Tanaka T, Fujita T. Cytoglobin, a novel globin, plays an antifibrotic role in the kidney. Am J Physiol Renal Physiol. 2010 Nov;299(5):F1120-33.
 17. Kawakami T, Inagi R, Wada T, Tanaka T, Fujita T, Nangaku M. Indoxyl sulfate inhibits proliferation of human proximal tubular cells via endoplasmic reticulum stress. Am J Physiol Renal Physiol. 2010 Sep;299(3):F568-76.
 18. Palm F, Nangaku M, Fasching A, Tanaka T, Nordquist L, Hansell P, Kawakami T, Nishijima F, Fujita T. Uremia induces abnormal oxygen consumption in tubules and aggravates chronic hypoxia of the kidney via oxidative stress. Am J Physiol Renal Physiol. 2010 Aug;299(2):F380-6.
 19. Nangaku M, Tanaka T. Forewarned is forearmed: arm with HIF activation. Nephrol Dial Transplant. 2010 May;25(5):1385-7.

[学会発表](計 19件)

1. Tetsuhiro Tanaka, Kumi Shoji, Junna Yamaguchi, Masaomi Nangaku. An antifibrotic role of hypoxia-inducible factor 3 in renal tubular cells. American Society of Nephrology Renal Week 2013. Atlanta, USA. Nov 5-10.
2. Tetsuhiro Tanaka, Junna Yamaguchi, Yoshiki Higashijima, Masaomi Nangaku. Indoxyl sulfate signals for rapid mRNA stabilization of Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 2 (CITED2) and suppresses the expression of hypoxia-inducible genes in experimental CKD and uremia. American Society of Nephrology Renal Week 2013. Atlanta, USA. Nov 5-10.
3. Tetsuhiro Tanaka, Kumi Shoji, Junna Yamaguchi, Masaomi Nangaku. HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR (HIF) 3 IS

- UPREGULATED BY HYPOXIA AND COUNTERACTS THE EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSDIFFERENTIATION PROGRAM. 2013 World Congress of Nephrology. Hong Kong, China. May31-Jun4.
4. Tetsuhiro Tanaka, Junna Yamaguchi, Masaomi Nangaku. INDOXYL SULFATE UPREGULATES CBP/p300-INTERACTING TRANSACTIVATOR 2 (CITED2) AND IMPAIRS THE INDUCTION OF HYPOXIA-INDUCIBLE GENES IN EXPERIMENTAL CKD AND HEART FAILURE MODELS. 2013 World Congress of Nephrology. Hong Kong, China. May31-Jun4.
 5. Tetsuhiro Tanaka, Junna Yamaguchi, Masaomi Nangaku. INDOXYL SULFATE SUPPRESSES TRANSACTIVATION OF HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR 1 AND DYSREGULATES HYPOXIA RESPONSE IN RATS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE AND EXPERIMENTAL HEART FAILURE. ERA-EDTA 50th meeting 2013. Istanbul, Turkey. May18-21.
 6. Tetsuhiro Tanaka, Junna Yamaguchi, Kumi Shoji, Masaomi Nangaku. Anthracycline inhibits recruitment of hypoxia-inducible transcription factors, blunts the induction of lysyl oxidase and suppresses migration of renal cell carcinoma. American Society of Nephrology Renal Week 2012. San Diego, USA. Oct30-Nov4.
 7. Tetsuhiro Tanaka, Kumi Shoji, Junna Yamaguchi, Masaomi Nangaku. Hypoxia-inducible factor (HIF)-3 is a HIF-1 target gene and counteracts migration of proximal tubular cells in hypoxia. American Society of Nephrology Renal Week 2012. San Diego, USA. Oct30-Nov4.
 8. Tetsuhiro Tanaka, Junna Yamaguchi, Masaomi Nangaku. Indoxyl sulfate induces Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2 (CITED2), via the mitogen-activated protein kinase cascade and impairs hypoxia response of tubular epithelial cells. American Society of Nephrology Renal Week 2012. San Diego, USA. Oct30-Nov4.
 9. Tetsuhiro Tanaka, Toshiro Fujita, Masaomi Nangaku. Indoxyl sulfate induces Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2, and impairs hypoxia response in proximal tubular cells. American Society of Nephrology Renal Week 2011. Philadelphia, USA. Nov8-13.
 10. Tetsuhiro Tanaka, Toshiro Fujita,

Masaomi Nangaku. Indoxyl sulfate impairs hypoxia response in cultured proximal tubular cells. 7th International Congress on Uremia Research and Toxicity 2011. Nagoya, Japan. May12-14.

11. Tetsuhiro Tanaka, Toshiro Fujita, Masaomi Nangaku. Impact of anthracyclines on hypoxia response in tubular epithelial cells. American Society of Nephrology Renal Week 2010. Denver, USA. Nov16-21.
12. 田中哲洋、正路久美、山口純奈、南学正臣 . 低酸素転写因子による腎線維化抑制機構の解析 .第 56 回日本腎臓学会学術総会 . 東京 . 2013 年 5 月 10 日 ~ 12 日 .
13. 田中哲洋、山口純奈、南学正臣 . インドキシル硫酸は CITED2 の発現誘導を介して CKD および心不全の低酸素遺伝子転写を減弱させる .第 56 回日本腎臓学会学術総会 . 東京 . 2013 年 5 月 10 日 ~ 12 日 .
14. 田中哲洋、南学正臣 . アントラサイクリン系抗癌剤は低酸素転写因子 HIF の抑制を介して尿細管上皮由来細胞の浸潤能を低下させる .第 55 回日本腎臓学会学術総会 . 横浜 . 2012 年 6 月 1 日 ~ 3 日 .
15. 田中哲洋、正路久美、山口純奈、南学正臣 . 尿細管における Hypoxia-inducible factor (HIF)-3 の低酸素発現調節機構の解析 . 第 55 回日本腎臓学会学術総会 . 横浜 . 2012 年 6 月 1 日 ~ 3 日 .
16. 田中哲洋、山口純奈、南学正臣 . インドキシル硫酸は MAP キナーゼ活性を介して Cited2 発現を亢進させ、尿細管の低酸素応答を減弱させる .第 55 回日本腎臓学会学術総会 .横浜 .2012 年 6 月 1 日 ~ 3 日 .
17. 田中哲洋、南学正臣、藤田敏郎 . 尿毒素インドキシル硫酸が尿細管低酸素応答に及ぼす影響 .第 54 回日本腎臓学会学術総会 . 横浜 . 2011 年 6 月 15 日 ~ 17 日 .
18. 田中哲洋、南学正臣、藤田敏郎 . アントラサイクリン系抗癌剤が尿細管低酸素応答に及ぼす影響 .第 53 回日本腎臓学会学術総会 .神戸 .2010 年 6 月 16 日 ~ 18 日 .
19. 田中哲洋、南学正臣、川上貴久、西島冬彦、坂内堅二、Fredrik Palm、藤田敏郎 . 尿毒素インドキシル硫酸は近位尿細管の酸素消費を亢進させ、慢性低酸素をもたらす . 第 53 回日本腎臓学会学術総会 . 神戸 . 2010 年 6 月 16 日 ~ 18 日 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 哲洋 (TANAKA, Tetsuhiro)
東京大学・医学部付属病院・助教
研究者番号：90508079

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：