

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23791759  
 研究課題名（和文）腎虚血再灌流障害に対する HIF-1 $\alpha$  の腎尿細管再生メカニズムの解明  
  
 研究課題名（英文）Amelioration of Acute Tubular Necrosis in Ischemic Acute Renal Failure was Impaired in Mice Lacking Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  Gene  
  
 研究代表者  
 山口 邦久（YAMAGUCHI KUNIHISA）  
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教  
 研究者番号：90464346

## 研究成果の概要（和文）：

HIF-1 $\alpha$  kd mice と WILD type mice の IRI モデルの腎 sample を用い DNA マイクロアレイを行い、網羅的遺伝子発現解析を分析した結果、ストレス応答や免疫応答、細胞・組織修復に関係していると考えられる遺伝子がいくつか存在することが分かった。そのうち“CHAC1”遺伝子に着目し分析を進めた。HK-2 細胞を使用した in vitro における確認実験では、real time PCR にて CHAC1 遺伝子の発現が顕著に上がっていることが確認でき、Western blot においてもタンパクレベルで同様の発現が確認できた。この結果に基づき、CHIP assay を用い CHAC1 の HIF-1 $\alpha$  による誘導性を確認しているが、現在進行中である。

## 研究成果の概要（英文）：

As a result of DNA microarrays were performed using kidney sample of the IRI model of HIF-1 $\alpha$  kd mice and WILD type mice, and having analyzed exhaustive gene expression analysis, some genes which were thought to be associated with a stress reply and an immune response, cellular tissue repair were found to be present. We paid its attention to “CHAC1” gene of those and pushed forward an analysis. By the in vitro confirmation experiment using HK-2 cells, it could be confirmed that the expression of CHAC1 gene rose in real time PCR conspicuously and was able to confirm similar expression at a protein level in Western blot. Based on these results, the inductivity by HIF-1 $\alpha$  of CHAC1 is confirmed using CHIP assay, but is progressing now.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：HIF-1・再生・IRI

## 1. 研究開始当初の背景

腎の虚血再灌流障害 (ischemia reperfusion injury ; IRI) は、急性尿細管壊死 (acute tubular necrosis ; ATN) を主体とする急性腎不全 (acute renal failure ; ARF) を引き起こす原因の一つである。臨床的にはショック、敗血症等の重篤な全身性疾患に関与した急性腎不全を多く経験するが、泌尿器科領域の手術では手技の一環として腎 IRI-ATN、ARF が問題になることがある。腎移植術や腎部分切除術はその代表例である。臨床的に ATN による ARF からの腎機能回復は、数日～数週間であることはよく知られているが、そのメカニズムの詳細は未だ不明である。IRI のように組織が低酸素状態に曝された場合、細胞内の酸素ホメオスターシスの維持において重要な役割を果たす転写因子として HIF(hypoxia inducible factor)-1、2 が知られている。HIF は、低酸素下におかれた細胞の生存に深く関わっていることが分かっており、過去には HIF-2 $\alpha$  knockdown mice に腎 IRI を引き起した場合、HIF-2 $\alpha$  の発現低下は、血管障害を主因として腎障害が増悪する (Kojima et al, J Am Soc Nephrol 18, 1218-1226, 2007) との報告があるが、腎再生との関与は明らかではない。我々は HIF-2 $\alpha$  が主に腎尿細管周囲の血管内皮細胞に発現が限られているのに対し、HIF-1 $\alpha$  は腎の全般に発現 (主に尿細管上皮細胞、糸球体上皮細胞) していることに注目し、HIF-1 $\alpha$  は HIF-2 $\alpha$  とは異なり、低酸素下での尿細管細胞の生存と、腎尿細管の再生にも関わらないかという仮説を立て、我々の研究室ですでに作成に成功している HIF-1 $\alpha$  kd(knockdown) mice と WILD type mice に対する同様の腎 IRI モデル (右腎摘除+左腎 45min 虚血-再灌流) を作成し、IRI モデルマ

ウスの腎障害の評価を行った。その結果、HIF-1 $\alpha$  kd mice では、WILD type mice と比較して BUN が高値に推移することが IRI 後の血液サンプルより確認できた。腎組織における尿細管壊死の所見も HIF-1 $\alpha$  kd mice で高度であり、さらに虚血-再灌流後 24 h 以降も腎機能の増悪、腎機能回復が遅延していた。一方 WILD type mice では、虚血-再灌流後 24 h より細胞増殖の指標である Ki-67(+) 細胞が、HIF-1 $\alpha$  kd mice と比較して有意に増加しており、腎発生や腎再生時に発現するとされる Pax-2(+) 細胞も同様に増加していることが免疫染色で確認できた。このモデルを基に、腎尿細管再生の分子メカニズムを解明進めることとした。

## 2. 研究の目的

(1) IRI モデルマウスの虚血-再灌流腎における発現遺伝子の解析

HIF-1 $\alpha$  kd mice と WILD type mice の IRI モデルにおいて、腎障害後の異なる time point で発現する遺伝子の相違を検討するため、マイクロアレイ等での解析を行い、IRI 後の腎尿細管再生に関わる遺伝子をピックアップする。

(2) 上記ピックアップ遺伝子に対し、in vitro でもその発現が再現できるか確認するため、尿細管細胞を使用した細胞レベルでの低酸素モデルを作成し確認実験を行う。

(3) 上記ピックアップ遺伝子と HIF-1 $\alpha$  の関連 (HIF-1 $\alpha$  による誘導であるかどうか等) を明らかにし、虚血-再灌流後の尿細管再生のメカニズムの解明へとすすめてゆく。

## 3. 研究の方法

(1) HIF-1 $\alpha$  kd mice と WILD type mice の IRI モデルの腎 sample (虚血再灌流なし、再灌流

後 6 h、12 h、24 h の時点で腎 sample) より、total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイにて網羅的遺伝子発現解析を行い、Agilent 社 : GeneSpring ソフトを使用し分析する。

(2) 細胞 (HK-2 細胞 : 正常ヒト近位尿細管上皮細胞細胞) を O<sub>2</sub> インキュベータ中で、低酸素 1% 24h 後、再酸素化 5% で培養し 3, 6, 12, 24, 36, 48h 毎の RNA を抽出し、real time PCR で標的遺伝子の発現を確認する。3) 上記細胞レベルでの条件で得られた sample を用い CHIP assay を行い、標的遺伝子が HIF-1 $\alpha$  による誘導であることの確認を行う。

#### 4. 研究成果

HIF-1 $\alpha$  kd mice と WILD type mice の IRI モデルの腎 sample を用い DNA マイクロアレイを行い、網羅的遺伝子発現解析を分析した結果、ストレス応答や免疫応答、細胞・組織修復に関係していると考えられる遺伝子がいくつか存在することが分かった。そのうち細胞のアポトーシスに関与することが報告されている” CHAC1” をピックアップし分析を進めた。HK-2 細胞を使用した in vitro における確認実験では、低酸素状態をインキュベータで安定的に再現することが困難であったため、CoCl<sub>2</sub> を使用し細胞サンプルを作成した。real time PCR にて CHAC1 遺伝子の発現を確認したところ、24h で CHAC1 遺伝子の発現が顕著にあがっていることが確認された。Western blot においてもタンパクレベルで同様の発現が確認できた。この結果に基づき、CHIP assay を用い CHAC1 の HIF-1 $\alpha$  による誘導性を確認しているが、現在進行中である。

原時点で CHAC1 に関する機能解析の報告は未だ少ない。今後 HIF-1 $\alpha$  との関係性を解明し、虚血-再灌流後の腎尿細管障害からの再生メ

カニズムの一端に関わる重要な遺伝子であるかどうかさらに研究を進めてゆく予定である。

#### 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 1 件)

- ① Tomoteru Kishimoto, Tomoya Fukawa, Kunihisa Yamaguchi, Yasuyo Yamamoto, Hiroyoshi Nakatsuji, Hirofumi Izaki, Masayuki Takahashi, Tomoharu Fukumori And Hiro-omi Kanayama  
Mineralocorticoid receptor expression in human penile corpus cavernosum (査読有) 60・1, 2 2013 21-26  
<http://dx.doi.org/10.2152/jmi.60.21>  
Originals

[学会発表] (計 6 件)

- ① Tomoharu Fukumori  
Clinical Singnificance of Neoadjuvant Androgen Blockade Before I-125 Prostate Brachytherapy in Patients with Localized Prostate Cancer Societe Internationale d' urolory 2012. 10. 03 Fukuoka International Congress Center (福岡県)
- ② Masayuki Takahashi  
The Low Trans-scrotal Orchidopexy for Undescended Testes Societe Internationale d' urolory 2012. 10. 02 Fukuoka International Congress Center (福岡県)
- ③ 高橋正幸  
進行性癌に対する分子標的薬の sequential therapy 日本泌尿器科学会 西日本総会 2011. 11. 11 石橋文化センター (福岡県)

④ アビルメド・シーレンヤンバ  
Participation of N-caderin in bladder  
cancer 日本泌尿器科学会総会  
2011. 4. 24 名古屋国際会議場(愛知県)

⑤ 中達弘能  
HGFによる膀胱がん浸潤亢進における  
Toll like receptor 4 (TLR4) の関与 日  
本泌尿器科学会総会 2011. 4. 23 名古  
屋国際会議場(愛知県)

⑥ 高橋正幸  
去勢抵抗性前立腺癌に対する抗アンドロ  
ゲン剤抗体療法と UFT 併用療法の有効性  
と安全性に関する無作為化第Ⅱ相臨床試  
験 日本泌尿器科学会総会 2011. 4. 22  
名古屋国際会議場(愛知県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山口 邦久 (YAMAGUCHI KUNIHISA)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号：90464346

### (2) 研究分担者

無

### (3) 連携研究者

無