

論文の内容の要旨

論文題目 Identification of CEBPD as a novel regulator of HIF-1 in hypoxic
and/ or inflammatory renal disease

(虚血および炎症性腎疾患における新規 HIF-1 制御遺伝子としての CEBPD の同定)

氏名 山口 純奈

要旨

慢性腎臓病 (Chronic kidney disease, CKD) の基礎疾患は、免疫学的異常に起因する慢性糸球体腎炎、代謝異常疾患である糖尿病、血行動態異常を背景とする高血圧性腎硬化症など多岐にわたる。しかし、それらの疾患がある一定の閾値を超えると、CKDの進行は不可逆的、かつ持続的となり、原疾患に非依存的となる。このCKDの進行は、尿細管間質病変と相関しているという最終共通経路の概念が広く受け入れられている。この概念において、以前から増悪因子として知られている蛋白尿のほかに、尿細管間質の慢性低酸素が重要な役割を担うことが明らかとなっている。尿細管間質病変は尿細管障害、尿細管周囲毛細血管網の脱落、炎症、間質の線維化によって特徴づけられる。腎臓は血流豊富な臓器であるにも関わらず、解剖学的構造から組織酸素分圧は低く、低酸素に陥りやすいという特徴を持つ。低酸素は細胞外基質の増生、尿細管細胞のアポトーシス、酸化ストレスの亢進、尿細管細胞での炎症性サイトカイン産生などにより、最終的に腎線維化を引き起こす。また、腎線維化は、尿細管間質への酸素供給の減少、尿細管周囲毛細血管網の変性・脱落、エリスロポエチン産生減少による貧血などの進行により、低酸素を助長する。これら一連のサイクルが腎障害を進行させる。

生体における酸素は細胞の代謝や生存、血管新生など生命の維持において重要な役割を果たしている。このため、酸素バランスの異常は虚血性心疾患、虚血性脳疾患、糖尿病、腫瘍、炎症性疾患や急性・慢性腎疾患など多くの病的現象を引き起こし、また増悪させる。組織の低酸素応答を司る転写因子として低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor, HIF) がある。HIFはグルコース輸送蛋白、血管新生因子、細胞増殖やアポトーシス、細胞間と細胞基質間の相互作用など100種類以上の遺伝子発現を転写レベルで制御し、細胞から組織・個体にいたる全てのレベルにおける低酸素適応を制御している。HIFは α サブユニットと β サブユニットから構成される。HIF- α の発現調節は、Prolyl Hydroxylase (PHD) による蛋白分解抑制によって主に行われる。通常酸素下ではHIF- α はPHDにより水酸化された後、プロテアソームにおいて蛋白分解を受ける。PHDは酸素を基質として必要とするため、低酸素下ではPHDの働きが抑制され、HIF- α が安定化し核内へ移行する。核内において、恒常的に発現しているHIF-1 β と結合し、標的遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー上のhypoxia response element (HRE) 配列に結合することで、標的遺伝子の発現を正に制御する。HIF- α にはHIF-1 α 、2 α 、3 α のアイソフォームが存在する。腎臓においては、HIF-1 α は糸球体上皮と尿細管上皮細胞に発現し、HIF-2 α は傍尿細管線維芽細胞と血管内皮細胞に発現し

ている。

以前から我々のグループは、HIF-1は急性・慢性腎障害の尿細管細胞に発現し、尿細管細胞障害に対し保護的な役割を果たすことを*in vivo*並びに*in vitro*で報告してきた。HIF-1が発現誘導されるにも関わらず腎障害が進行する理由として、HIF-1の発現誘導が不十分であることが一因であることがわかっている。実際、腎臓においてHIF-1の発現を増加させることにより腎障害が軽減したということが複数報告されており、HIF-1の発現調節は腎疾患の治療標的として着目されている。HIF-1 α の発現制御はPHDによるもの以外も存在し、HIF-1 α の転写・翻訳レベルでの調節も重要であることが知られている。成長因子や炎症性サイトカインなどにより、通常酸素下においてもHIF-1 α の発現が亢進・安定化する場合がある。この際には、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) /AKT/ mammalian target of rapamycin 経路、nuclear factor- κ B (NF- κ B) 経路、ERK mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路などを通じてHIF-1 α の転写や翻訳の促進がおこる。

そこで本研究では、(1) 虚血性腎疾患での治療標的となりうるHIF-1の新規調節遺伝子を同定すること、(2) 同定した遺伝子の虚血性腎疾患での発現プロファイルと機能を同定すること、(3) 同定したHIF-1調節遺伝子とHIF-1が担う役割を炎症と低酸素の中で解明することを目的とした。

*In vivo*におけるHIF-1調節遺伝子のスクリーニングとして、以前当研究室で行ったラット腎動脈狭窄 (RAS) モデル (day3, day7) 腎皮質のマイクロアレイ解析の結果を用い、sham腎と比較し、RASモデルで継続的に発現上昇した150遺伝子を抽出した。*In vitro*におけるHIF-1調節遺伝子のスクリーニングとして、HIF-1の発現調節を、これら150遺伝子に対するshRNA発現プラスミドと、ヒト子宮頸癌由来であるHeLa細胞を用いて、分子生物学的に検索した。その結果、HIF-1 α 蛋白発現量、HREレポーターアッセイ、HIF-1標的遺伝子の発現量変化から、CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) ファミリーに属しているCCAAT/enhancer-binding protein δ (CEBPD) を新規HIF-1調節遺伝子として同定した。

CEBPDは哺乳類間において相同性が保存されている主要な転写因子である。その働きは細胞によって異なるが、脂肪細胞の分化、マクロファージでの炎症応答、いくつかの癌における癌抑制遺伝子などとして働くことが知られているものの、CEBPDの腎臓における発現や機能についてはほとんど知られていない。そこで、私は虚血性腎疾患におけるCEBPDの発現を解析することを第一目的とした。

低酸素チャンバーを用いてマウスを低酸素状態 (8% O₂, 6時間) に馴化させ、この低酸素マウスから腎臓を採取した。低酸素マウスの腎臓におけるCEBPDのmRNA発現量を確認したところ、mRNA発現上昇が認められた。さらにラット急性、慢性腎虚血モデルでのCEBPDの発現を腎皮質のmRNA発現量により解析した。急性虚血性腎疾患として虚血再灌流とシスプラチン腎症モデルを、慢性虚血性腎疾患としてRASと慢性腎不全 (5/6腎摘)モデルを作成した。PAS染色でこれらの疾患が適切に惹起されていることを確認した。全てのモデルにおいてCEBPDの発現亢進を認めた。さらに、腎組織免疫染色によりCEBPDの局在は、虚血性腎疾患におけるHIF-1の発現誘導部位である尿細管核にあることを見出した。

尿細管細胞においてもCEBPDがHIF-1調節能をもつか検討するために、ヒト培養尿細管細胞

(HK-2) を用いて以降の解析を行った。HK-2細胞において、低酸素刺激によりCEBPDの発現はHIF-1非依存的に亢進し、低酸素下でのHIF-1 α 蛋白発現量とHIF-1活性 (HRE活性とHIF-1標的遺伝子であるglucose transporter 1とvascular endothelial growth factorの発現量) を調節することをCEBPDに対するsiRNAを用いたノックダウン実験により証明した。

次に、CEBPD/HIF-1経路が通常酸素下で活性化される可能性について検討した。炎症時には、組織が低酸素に陥る前からHIF-1が活性化されることが報告されている。腎臓においても、尿細管間質での炎症は、腎内在細胞と浸潤炎症細胞がオートクラインとパラクラインに働き、さらにここにサイトカインも加わることでより複雑な病態を形成することが知られている。実際、上述の急性及び慢性虚血性腎疾患モデルの腎臓において、マクロファージの浸潤を免疫染色により確認し、腎皮質での各種サイトカインやケモカインの発現上昇を確認した。CEBPDは炎症応答遺伝子であることも加味すると、腎臓において、マクロファージや腎内在細胞から産生される炎症刺激により、尿細管細胞において、通常酸素下でもCEBPD/HIF-1経路が誘導されると可能性が考えられた。そこで、HK-2細胞をリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、インターロイキン-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β などの炎症性刺激で刺激したところ、IL-1 β 刺激下においてHIF-1 α 蛋白発現量はCEBPDに依存して、容量・時間依存性に亢進した。

さらに、CEBPDがHIF-1 α 蛋白発現量を調節する機構について検討した。HIF-1 α の蛋白発現量はPHDにより大きく規定されることから、PHDのmRNA発現量変化を検討した。IL-1 β 刺激下でのPHD発現量は変化を認めず、CEBPDによるHIF-1 α 発現調節にPHDが関与している可能性については否定的であった。HK-2細胞においてMG132を用いて蛋白分解阻害を行ったところ、CEBPDをノックダウンするとHIF-1 α 蛋白量が減少したことから、CEBPDはHIF-1 α を蛋白分解レベルでは調節せず、転写あるいは転写後、翻訳調節により調節していることが示唆された。アクチノマイシンによる蛋白合成阻害を行ったところ、低酸素下とIL-1 β 刺激下でのHIF-1 α 蛋白量が減少した。さらに、HIF-1 α のmRNA発現量は低酸素刺激とIL-1 β 刺激いずれによっても上昇し、これはCEBPDに依存していた。このことは、CEBPDがHIF-1 α を転写あるいは転写後調節を行っていることを示唆した。CEBPDは転写因子であり、HIF-1 α のプロモーター領域にもCCAAT結合ドメインが存在したため、ヒトHIF-1 α プロモーターをクローニングし、プロモーター解析を行った。CEBPDはHIF-1 α のプロモーター活性に影響を与えなかった。そこで、HIF-1 α のRNA安定性にCEBPDが寄与する可能性について、アクチノマイシンを用いた経時的なmRNAの発現量を調べたところ、IL-1 β と低酸素のいずれの刺激においても、HIF-1 α のmRNAが安定化された。このことから、CEBPDはHIF-1 α のRNA安定性を介してその発現量を調節していることが示された。

最後に、低酸素あるいはIL-1 β によりCEBPDが誘導される機序について検討した。低酸素応答や炎症応答で活性化されるPI3K/AKT経路とNF- κ B経路の関与の可能性を考えた。それぞれに対する阻害剤を用いてIL-1 β 刺激をHK-2細胞に行ったところ、NF- κ B阻害によりCEBPDとHIF-1 α の蛋白発現量が減少した。次に、NF- κ B阻害下でCEBPDを強制発現させた場合にHIF-1 α の発現が回復するかということ、CEBPDのstable cloneをHK-2細胞においてレトロウイルスを用いて作成

し検討した。CEBPDを強制発現したHK-2細胞では、NF- κ B阻害下でもHIF-1 α の発現が保たれた。これらのことから、低酸素及びIL-1 β はNF- κ B経路を介してCEBPDを活性化し、HIF-1 α 蛋白発現を制御することが明らかとなった。

以上より、CEBPDはHIF-1の新規調節遺伝子であり、炎症と低酸素を架橋する重要な役割を担うことが示された。CEBPDは虚血性腎疾患の尿細管細胞に発現し、HIF-1 α の発現をRNA安定化により亢進した。HIF-1は急性 (acute kidney injury, AKI)・慢性腎障害 (CKD) において尿細管細胞を保護する役割を担うことから、この新たなCEBPD/HIF-1経路の発見は、AKI・CKDにおいてともに新たな治療ターゲットとなる可能性を有している。