

**特集：生体の低酸素応答と疾患治療への応用****腎臓における酸素代謝異常と、新規低酸素治療ターゲットの探索**

南 学 正 臣

東京大学医学部附属病院腎臓内分泌内科

(平成23年2月28日受付)

(平成23年3月5日受理)

さまざまな腎臓病において、末期腎不全に至る final common pathway は、主に慢性低酸素による尿細管間質障害であることが明らかになってきた。腎臓はエネルギー需要が多い上に動静脈酸素シャントがあり、低酸素になりやすい臓器である。腎臓病においては、レニン・アンジオテンシン系の亢進による下流の尿細管周囲毛細血管の機能的血流低下、尿毒素に起因する尿細管での酸素消費亢進、腎性貧血などが複合的に絡み合っており、腎臓の慢性低酸素状態を引き起こす。生体は低酸素に対する防御機構として hypoxia-inducible factor (HIF) による転写調節系を持っており、その活性化によりさまざまな低酸素応答が協調的に引き起こされる。実験動物モデルにおいて HIF の活性化が種々の腎疾患モデルで有効であることが示されており、現在 HIF の反応応答に関する詳細な検討を ChIP-Seq などの手法を用いて行っている。

**はじめに**

慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD) は、欧米でも本邦でも国民の1割が罹患しており、末期腎不全 (end stage renal disease: ESRD) の母体となるのみならず、心血管系合併症も引き起こし、医学的にも社会的にも大きな問題になってきている。CKD では、ある一定のレベル以上に腎機能が低下した場合は、それ以降、原疾患が何であれ、同様の不可逆な経過をたどり末期腎不全に至る final common pathway があると考えられている。

近年の研究により、腎臓における final common pathway は、主に慢性低酸素による尿細管間質障害であることが明らかになってきた。本稿では、低酸素が尿細管間質障害をもたらす、更にそれが腎機能低下に結びつくメカニズムに関して概説し、現在行なわれている治療、今後、発展が見込まれる治療についても検討を加えていく。

**腎臓の低酸素状態発生機序**

慢性的な腎機能低下をもたらす final common pathway としては、これまでさまざまなものが検討されてきた。Barry Brenner らによる糸球体過剰濾過説は、血行動態の変化により糸球体が硬化に陥ると、残存する糸球体により多くの負担がかかり、結果として残った糸球体も硬化に陥るとするもので、糸球体硬化を引き起こす final common pathway として確立しているが、多くの研究者が病理学的による詳細な検討により、糸球体の変化よりも尿細管間質の変化の方が、腎機能予後に大きく関わってくるのが分かってきた。この尿細管間質の障害を説明できる統一的仮説として提唱・検証されているのが、慢性低酸素仮説 (chronic hypoxia hypothesis) である。

腎臓では、解剖学的に動脈と静脈が近接して並走しており、酸素が毛細血管に行く前に直接動脈から静脈に移動してしまう動静脈酸素シャントという現象がある。このため、腎臓は酸素の取り込み効率の非常に低い臓器である。更に、健常な腎臓は1日に150Lを糸球体で濾過し、その99%を尿細管で再吸収している。ナトリウムの再吸収は主に Na-K-ATPase を利用し、エネルギーを消費して行われるため、腎臓は非常にエネルギー需要の高い臓器となっている。このため、腎臓は非常に酸素不足になりやすい臓器となっている。

糸球体硬化による下流の尿細管周囲毛細血管の物理的・機能的血流低下およびレニン・アンジオテンシン系の亢進による下流の尿細管周囲毛細血管の機能的血流低下は、尿細管細胞および間質細胞の虚血を引き起こす。更に、尿細管間質の線維化により毛細血管が荒廃し、その結果として起こる支配領域の虚血から更に尿細管間質細胞が障害を受ける。加えて、尿細管間質の炎症から活性酸素が発生すると、NO が消費されて腎血流が低下すると同時に、

ミトコンドリアの呼吸の脱抑制が起こり、酸素消費の亢進も引き起こす。CKD でみられる腎性貧血も、腎臓への酸素供給を低下させる可能性がある。これらの事象が複合的に絡み合って、腎臓の慢性低酸素状態を引き起こし、末期腎不全への final common pathway となり、結果的に腎機能は不可逆的に低下していく<sup>1-2)</sup>。

## 低酸素に対する応答

生体は低酸素に対応して、種々の遺伝子の転写調節を行うが、その中心に位置するのが hypoxia inducible factor (HIF) であり、腎臓に加えてさまざまな臓器で、低酸素に対する適応応答の中心的役割を果たしている<sup>3-4)</sup>。

HIF は  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖からなる二量体であり、前者が酸素感受性を持ち、後者は芳香族炭化水素受容体各輸送体としての作用を持つ。 $\alpha$  鎖は、通常の酸素濃度下では、prolyl hydroxylase (PHD) によりプロリン残基の水酸化を受け、その結果 von Hippel-Lindau protein (pVHL) と結合して速やかに分解される。PHD は酸素濃度依存性に作用するために、低酸素下では HIF のプロリンの水酸化が起きず分解を免れ、細胞内に蓄積する。この低酸素下で水酸化を受けなかった  $\alpha$  鎖は核内に移行し、 $\beta$  鎖と結合し二量体を形成する。そして、標的遺伝子の低酸素応答配列 (HRE) に結合することで転写を調整する。HRE は血管内皮増殖因子 (VEGF) やエリスロポエチン (EPO)、解糖系酵素、抗酸化酵素などの多くの遺伝子の転写を活性化することで、低酸素に対応している。

HIF- $\alpha$  には、 $1\alpha$ 、 $2\alpha$ 、 $3\alpha$  の3つのアイソフォームが存在している。HIF- $1\alpha$  と HIF- $2\alpha$  は構造と機能が似ており、48% のアミノ酸を共有する。HIF- $1\alpha$  と HIF- $2\alpha$  のいずれのノックアウトマウスも胎児期か新生児期に死亡することから、いずれも生体に必須で non-redundant な働きをしていることが分かる。腎臓では、HIF- $1\alpha$  が糸球体上皮細胞や尿細管上皮細胞に発現、HIF- $2\alpha$  は尿細管周囲線維芽細胞と血管内皮細胞に発現している。一方  $3\alpha$  は構造上活性ドメインを欠くため、dominant negative として働き  $1\alpha$ 、 $2\alpha$  の作用抑制効果があるとされる。

HIF- $2\alpha$  は、内皮細胞における SOD (superoxide dismutase) やカタラーゼなどの抗酸化酵素の発現調整により、抗酸化ストレス作用を介した内皮保護効果をもつ<sup>5)</sup>。PHD1 ノックアウトマウスでは酸化ストレスが軽減され、骨格筋での酸素消費量が低下することで虚血急性期の筋線維の障害を保護するが、これは HIF- $2\alpha$  の作用である。われわれは、HIF- $2\alpha$  ノックダウンマウスでの解析により、HIF- $2\alpha$  は腎虚血再灌流障害における内皮細胞保護効果を有することを示した<sup>6)</sup>。最近では、マウスを

用いた研究やヒト多血症家系の遺伝子異常の解析により、HIF- $2\alpha$  は EPO の生理的調節遺伝子であることが判明している<sup>7)</sup>。

## CKD の治療

現在広く行われている CKD の治療法は、腎臓の低酸素を改善する作用があり、そのことが腎保護の重要な機序となっている可能性がある。

### (1) レニン・アンジオテンシン (RAS) 阻害薬

RAS 阻害薬の腎保護のエビデンスは臨床的に確立しているが、その腎保護の機序として腎臓の慢性低酸素の改善が重要と考えられる。アンジオテンシン II は輸出細動脈を強力に収縮させるため、RAS 阻害薬は、輸出細動脈を拡張することで、糸球体内圧を低下させるのみならず、糸球体の下流にある尿細管周囲毛細血管網の血流も改善し、低酸素を改善する。実際、5/6腎摘腎不全モデル、糖尿病性腎症モデルなどで、RAS 阻害薬による腎臓の低酸素改善が示されている。

更に RAS 阻害薬を使用することにより、アンジオテンシン II の type I 受容体を阻害することで、酸化ストレスの生成を抑制することができる。酸化ストレスは、ミトコンドリア呼吸の脱抑制を介して酸素代謝異常による低酸素を引き起こすため、酸化ストレスの抑制は低酸素状態の改善につながる。

### (2) 貧血の改善

腎性貧血は、erythropoiesis stimulating agents (ESA) の投与により改善可能であり、それにより組織への酸素供給効率が改善する。臨床的には CHOIR, CREATE, TREAT などの大規模臨床試験により、Hb を一定まで上げれば正常化することによる上乗せ効果はないことが示されている。この効果の欠如は、ESA に対し治療抵抗性の患者に対し大量の ESA 投与を必要とすることによる影響である可能性がある。

### (3) 尿毒素の吸着

最近われわれは、スウェーデンの Fredrik Palm との共同研究で、尿毒素であるインドキシル硫酸が尿細管細胞の酸化ストレスを亢進し、酸素消費を増加させることで、腎臓の低酸素状態を悪化させることを見出した<sup>8)</sup>。ラットおよびヒトから単離した近位尿細管は、インドキシル硫酸添加により、添加量依存性に酸素消費量の亢進を認めた。インドキシル硫酸による酸素消費亢進は、apocynin により消失し、また *in vivo* siRNA により NADPH oxidase

のサブユニットをノックダウンしたラットより単離した近位尿細管では、インドキシル硫酸による酸素消費亢進が認められなかった。更に、慢性腎不全実験動物モデルにおいて AST-120 を投与して尿毒素を吸着し血中インドキシル硫酸濃度を低下させると、腎臓の低酸素も改善し、組織学的障害の軽減がみられた。AST-120 は既に本邦では臨床応用されており、CKD 患者でも尿毒症症状の軽減のみならず、腎保護に働く可能性があると考えられる。

### 新規 HIF 活性化療法

HIF を活性化することは、CKD に加え、虚血性心疾患、脳卒中など、さまざまな疾患で有効である可能性がある<sup>9)</sup>。われわれが2003年に初めて HIF の活性化による preconditioning により腎臓が虚血再還流障害に対し抵抗性になることを示して以来、多くのグループが多彩な腎臓病モデルにおいて HIF 活性化の予防および治療効果を示している (表)。HIF の活性化は、PHD を阻害することによって行われ、cobalt chloride, carbonic monoxide や PHD の特異的阻害薬などが使用されている。

HIF の活性化は、さまざまな適応応答を協調的に誘導するため、非常に有効な治療手段となりうる。最近われわれは HIF のターゲット分子の一つである新規グロビン分子の cytoglobin が腎臓の間質細胞に発現しており、低酸素状態で発現が亢進して、抗酸化作用と抗線維化作用を持つことを遺伝子改変動物を用いて明らかにした<sup>10,11)</sup>。しかし、HIF は多くの反応の上位にある転写調節因子であり免疫系から発生に至る多くの局面で重要な役割を果たしているため<sup>12,13)</sup>、その反応経路を十分に解明して治療応用する必要がある。現在、われわれは ChIP-

Seq の方法を用いて、HIF の抗体で免疫沈降したサンプルをゲノムワイドにシーケンスすることで HIF のターゲット分子を網羅的に解析することにより、HIF の反応経路を詳細に解析中である<sup>14)</sup>。

### まとめ

腎臓病と尿細管間質障害、慢性低酸素の関係について概説した。その間には HIF が防御因子として大きく関わっていることが示唆される。今後、HIF の反応経路の解明が進むことにより、腎臓病の低酸素改善による新規治療法が開発されるのみならず、虚血性心疾患・脳卒中など他分野においても大きな進展につながるような研究が発展することが期待されている。

### 文 献

- 1) Mimura, I., Nangaku, M.: The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nat. Rev. Nephrology*, 6 : 667-678, 2010
- 2) Nangaku, M.: Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: A Final Common Pathway to End-stage Renal Failure. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 17 : 17-25, 2006
- 3) Tanaka, T., Nangaku, M.: The role of hypoxia, increased oxygen consumption, and hypoxia-inducible factor-1 alpha in progression of chronic kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 19 : 43-50, 2010
- 4) Nangaku, M., Inagi, R., Miyata, T., Fujita, T.: Hypoxia and hypoxia inducible factor in renal disease. *Nephron Exp. Nephrol.*, 110 : e1-e7, 2008
- 5) Aragones, J., Schneider, M., Van Geyte, K., Fraisl, P., *et al.*: Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd 1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat. Genet.*, 40 : 170-180, 2008
- 6) Kojima, I., Tanaka, T., Inagi, R., Kato, H., *et al.*: Protective role of hypoxia-inducible factor-2 alpha against ischemic damage and oxidative stress in the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 18 : 1218-1226, 2007
- 7) Percy, M. J., Furlow, P. W., Lucas, G. F., Li, X., *et al.*: A gain-of-function mutation in the HIF2A gene in familial erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.*, 358 : 162-168, 2008
- 8) Palm, F., Nangaku, M., Fasching, A., Tanaka, T., *et al.*: Uremia induces abnormal oxygen consumption in tubules and aggravates chronic hypoxia of the kidney via oxidative stress. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*

表：HIF 活性化による腎臓病モデルの予防と治療

ischemia-reperfusion	Matsumoto <i>et al.</i> JASN 2003 Bernhardt WM <i>et al.</i> JASN 2006 Faleo G <i>et al.</i> Transplantation 2008 Ma D <i>et al.</i> JASN 2009
chronic glomerulonephritis	Tanaka <i>et al.</i> Kidney Int 2005
remnant kidney	Tanaka <i>et al.</i> Lab Invest 2005 Song <i>et al.</i> NDT 2009
cisplatin nephropathy	Tanaka <i>et al.</i> Am J Physiol 2005 Weidemann <i>et al.</i> JASN 2008
Habu snake venom nephritis	Kudo <i>et al.</i> Nephron 2005
diabetic nephropathy	Ohtomo <i>et al.</i> NDT 2008
isolated perfused kidney	Rosenberger <i>et al.</i> NDT 2008
allograft survival	Bernhardt <i>et al.</i> PNAS 2009

- 299 : F380-6, 2010
- 9) Tanaka, T., Nangaku, M. : Drug discovery for overcoming chronic kidney disease (CKD) : prolyl-hydroxylase inhibitors to activate hypoxia-inducible factor (HIF) as a novel therapeutic approach in CKD. *J. Pharmacol. Sci.*, **109** : 24-31, 2009
- 10) Nishi, H., Inagi, R., Kawada, N., Yoshizato, K., *et al.* : Cytoglobin, a novel member of the globin family, protects kidney fibroblasts against oxidative stress under ischemic conditions. *Am. J. Pathol.*, **178** : 128-39, 2011
- 11) Mimura, I., Nangaku, M., Nishi, H., Inagi, R., *et al.* : Cytoglobin, a novel globin, plays an antifibrotic role in the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **299** : F1120-33, 2010
- 12) Kurobe, H., Urata, M., Ueno, M., Ueki, M., *et al.* : Role of hypoxia-inducible factor 1 alpha in T cells as a negative regulator in development of vascular remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **30** : 210-7, 2010
- 13) Tomita, S., Ueno, M., Sakamoto, M., Kitahama, Y., *et al.* : Defective brain development in mice lacking the Hif-1alpha gene in neural cells. *Mol. Cell Biol.*, **23** : 6739-49, 2003
- 14) Mimura, I., Wada, Y., Tsutsumi, S., Aburatani, H., *et al.* : Genome-wide analysis of hypoxic inducible factor 1 binding sites in human endothelial cells under hypoxia (abstract). ISN-NEXUS, April 16, 2010

## *Abnormal oxygen metabolism of the kidney and identification of novel therapeutic targets against hypoxia*

*Masaomi Nangaku*

*Division of Nephrology and Endocrinology, University of Tokyo School of Medicine, Tokyo, Japan*

### SUMMARY

Chronic hypoxia in the tubulointerstitium serves as a final common pathway to end stage kidney disease in a variety of kidney diseases. Oxygen demand of the kidney is large, and the oxygen uptake efficiency of the kidney is relatively low due to arterio-venous oxygen shunt. Thus, the kidney can be hypoxic easily. In diseased kidneys, induction of hypoxia of the kidney is multifactorial. These factors include reduction of peritubular capillary blood flow due to activation of the renin-angiotensin system, increased oxygen consumption by tubular cells due to uremia, and renal anemia. Cells are endowed with the defensive mechanism against hypoxia, and hypoxia-inducible factor (HIF) serves as a master gene switch of various adaptive mechanisms, and activation of HIF induces a number of defensive responses in a coordinated manner. Many studies showed protective effects of HIF activation in experimental models of kidney disorders, and we are now performing detailed analysis of responses induced by HIF activation utilizing ChIP-Seq.

Key words : hypoxia, oxygen, HIF, ischemia, chronic kidney disease