

博士論文

論文題目 低酸素環境における HIF-1 α と SMAD3 の協調的な
転写制御が尿細管上皮細胞に与える影響

氏名 串田 夏樹

低酸素環境における HIF-1 α と SMAD3 の協調的な転写制御が尿細管上皮細胞に与える影響

東京大学大学院医学系研究科 博士課程 内科学専攻

指導教員名 南学正臣

申請者名 串田夏樹

目次

第1章 要旨

第2章 序文

第3章 方法

3.1 細胞培養

3.2 RNA-seq

3.3 DNA microarray

3.4 クラスタリング

3.5 Gene annotation

3.6 定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR)

3.7 クロマチン免疫沈降 (ChIP) -seq

3.8 箱ひげ図

3.9 Motif analysis

3.10 ChIP-seq Enrichment Site Map

3.11 ChIP-qPCR

3.12 small interfering RNA (siRNA)

3.13 ウェスタンブロッティング

第4章 結果

4.1 低酸素刺激による遺伝子発現の変化の網羅的解析

4.2 低酸素刺激後、各時間に増加した遺伝子の annotation

4.3 ChIP-seq による HIF-1 α の細胞特異的な転写制御の網羅的解析

4.4 低酸素と TGF- β による遺伝子発現の変化の網羅的解析

4.5 HIF-1 α と SMAD3 の結合部位の網羅的解析

4.6 HIF-1 α と SMAD3 の結合部位の定量的解析

4.7 低酸素が TGF- β の発現に与える影響

第 5 章 考察

5.1 低酸素刺激による遺伝子発現の変化の網羅的解析

5.2 低酸素刺激後、各時間に増加した遺伝子の annotation

5.3 ChIP-seq による HIF-1 α の細胞特異的な転写制御の網羅的解析

5.4 低酸素と TGF- β による遺伝子発現の変化の網羅的解析

5.5 HIF-1 α と SMAD3 の結合部位の網羅的解析

5.6 HIF-1 α と SMAD3 の結合部位の定量的解析

5.7 低酸素が TGF- β の発現に与える影響

第 6 章 結語

第 7 章 引用文献

謝辞

第1章 要旨

医療上の重要な問題である腎障害において、尿細管間質の低酸素が中心的な役割を果たすとする低酸素仮説が注目を集めている。低酸素が腎臓尿細管上皮細胞に与える影響を、主に RNA-seq と ChIP-seq を用いて調べた。まず低酸素における遺伝子発現の変化が細胞特異的であることが確認された。低酸素による転写制御が細胞特異的であることの一部は、低酸素における中心的な転写因子である HIF-1 α のゲノム上における結合領域が細胞特異的であることと関係していた。低酸素以外にも腎障害を増悪させる因子として、サイトカインの一種である TGF- β とその下流の転写因子である SMAD3 が知られている。本研究で尿細管上皮細胞において HIF-1 α と SMAD3 がゲノムワイドに共局在していることが確認され、さらに腎障害に関する遺伝子の発現を相加的に亢進させていることも確認された。腎障害の重要な因子である、低酸素によって導入された HIF-1 α が転写因子レベルで SMAD3 の結合を促進し、腎障害に影響を与えていると考えられた。

第2章 序文

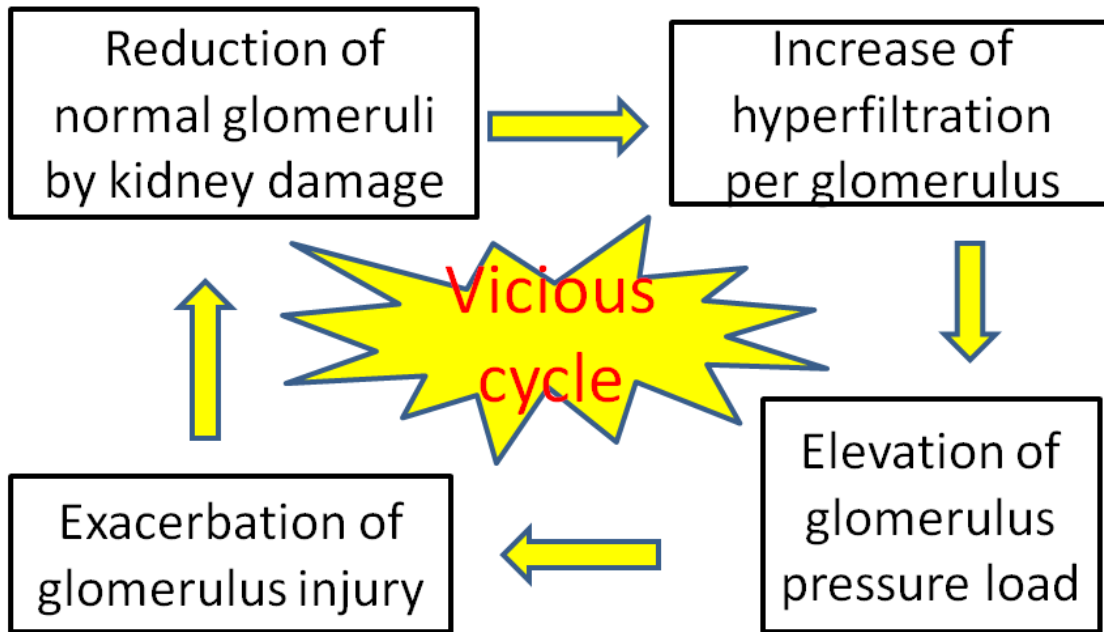
腎代替療法や腎移植を必要とする末期腎不全患者は増加傾向にあり、2011年の国内における維持透析患者は約30万人に達した[1]。慢性腎臓病（CKD）患者は末期腎不全に至る予備軍であり、日本におけるCKD患者の推定数は1329万人と莫大なものとなっている。またCKDは末期腎不全の危険因子であるのみでなく、心血管障害など腎臓以外の臓器の危険因子でもある。このように腎障害は生命、健康を脅かす重大な因子となりうる。

腎不全は、大きく急性腎不全と慢性腎不全（CKDとある程度共通する概念である）に分類される。急性腎不全の原因としては、腎前性、腎後性、腎性がある。急性腎不全の原因には比較的治療介入しやすいものもあるため可逆性が見込める。この点は慢性腎不全との大きな相違点である。ただし、急性腎不全から慢性腎不全に至る場合があること、また他臓器不全と合併した際に死亡率が高くなることなど、軽視できる病態ではない。

慢性腎不全は、不可逆性の進行性腎障害によって体液の恒常性が維持できなくなる病態をいい、透析導入患者の基礎疾患としては糖尿病性腎症と慢性糸球体腎炎が特に多い。慢性腎不全の原因は数多くあるが、末期腎不全の病理像には共通する特徴があり、糸球体硬化と尿細管間質の線維化が認められる。そのため末期腎不全に至る、共通の腎障害進行機序が想定されている。

古典的な説として糸球体硬化に注目した **Brenner** の糸球体過剰濾過説がある[2]。

様々な原因で腎臓が障害されネフロンが減少すると、残存しているネフロンの糸球体濾過量が増大するため、圧負荷によって糸球体障害がさらに増悪する。この悪循環が回ることによって、末期時腎不全に至るとの説である。

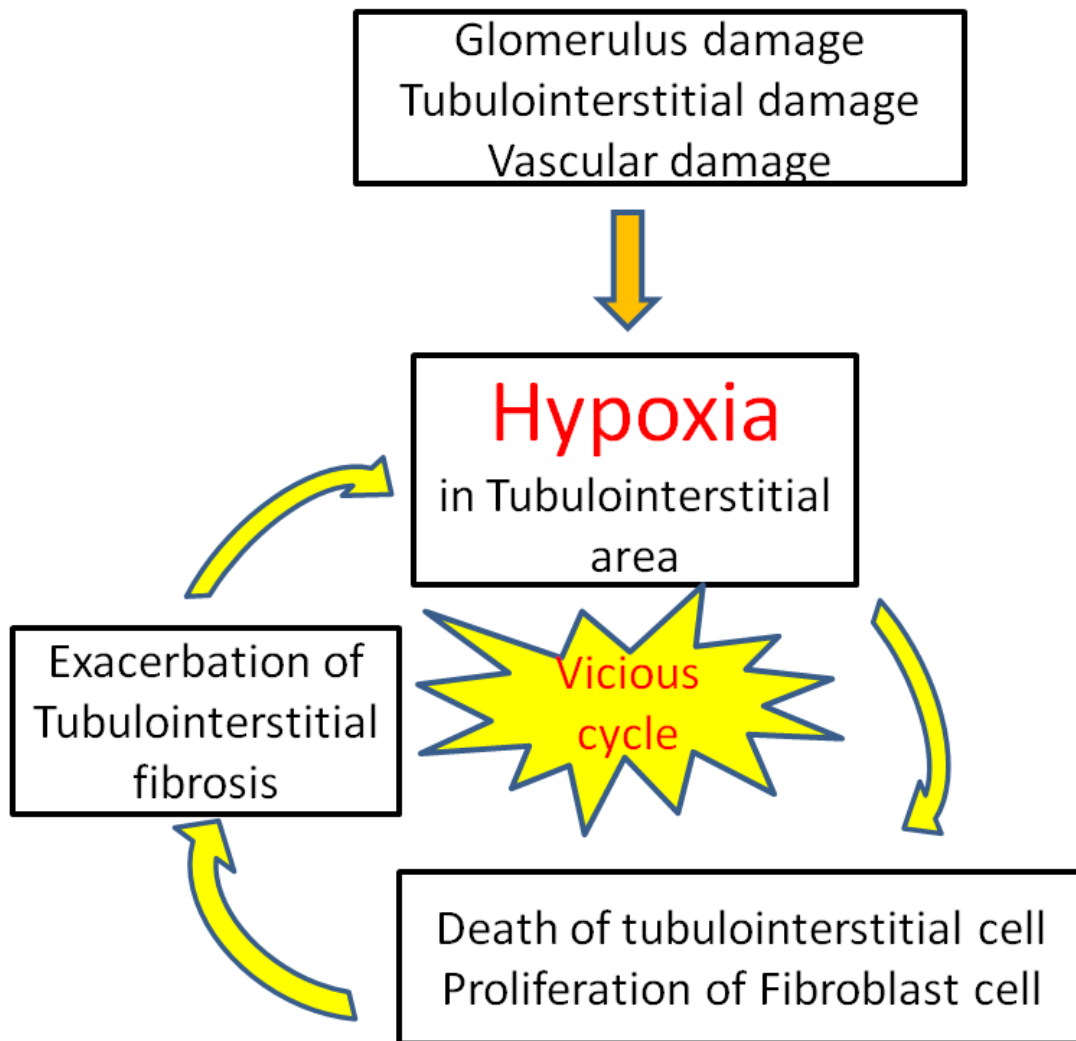


(図 1) 糸球体過剰濾過説

糸球体障害が非可逆的腎障害の原因かつ結果であり、中心的な役割を果たしているとの説である。

しかし一方で、腎機能低下は、糸球体障害よりも尿細管間質線維化と強く相関しているとする病理学的解析が報告されている[3]。尿細管間質の障害こそが慢性的な腎障害に共通する重大な因子であり、特に低酸素がその中心となっているとする慢性低酸素仮説が近年注目を集めている[4]。

慢性低酸素仮説では、腎障害と低酸素の関係が以下のように説明される。様々な原因で尿細管間質が障害されると、尿細管周囲毛細血管の障害・減少が誘導される。その結果、血流が低下し、尿細管間質への酸素供給も減少する。また尿細管間質障害が起こると、間質の線維化が起こる。すると毛細血管に変化がなくても、線維化した間質によって酸素の拡散が障害され、酸素の供給が減少する。つまり尿細管間質障害は低酸素の結果であるとともに、低酸素の原因にもなる。この尿細管間質の低酸素を中心とする悪循環が腎障害の原因となる。



(図 2) 慢性低酸素仮説

尿細管間質の低酸素が非可逆的腎障害の原因かつ結果であり、中心的な役割を果たしているとの説である。

また低酸素は急性腎障害においても重要な因子であり[5]、低酸素は急性期から慢性期まで腎障害に影響を与えていると考えられている。

低酸素における中心的な転写因子として HIF (hypoxia-inducible factor) が知られている[6]。HIF は複数の isoform を持ち、低酸素における転写制御では HIF-1 α が重要である。HIF-1 α は通常酸素では速やかに分解されるが[7]、低酸素では安定しており、もともと安定的な HIF-1 β と 2 量体を形成することで下流の遺伝子発現を促進する。蛋白質である HIF-1 α の分解速度という non-genomic な反応が、低酸素と転写制御をつなぐカギとなっている。

低酸素、HIF の経路以外にも腎障害に置いて重要な経路として、TGF- β 、SMAD3 の経路が知られている[8]。TGF- β はサイトカインの一種であり、主にその下流にある SMAD3 を活性化することで、遺伝子発現に影響を与える。この経路は腎障害と関係していると考えられており、例えば腎障害モデルで腎臓における TGF- β の発現が増加することや[9]、SMAD3 のノックアウトマウスでは腎障害が抑制されることが知られている[10]。

腎障害において低酸素や TGF- β が重要であると考えられているが、それ以外にも腎障害と関係する因子は数多く報告されている[11]。実際の腎障害で、これらの因子がどのように複合して作用しているか、その機序について十分解明されているとは言い難い。本研究では、低酸素の下流にある HIF-1 α と、TGF- β の下流にある SMAD3 の腎臓尿細管上皮細胞における相互作用について、主に RNA-seq、ChIP-seq を用いて、転写制御機構を網羅的に解析した。

第3章 方法

3.1 細胞培養

ヒト正常腎由来の不死化された細胞株である HK-2 細胞を用いた[12]。HK-2 細胞は、尿管上皮細胞のモデルとしてよく利用されている細胞である。培地は DMEM/F-12 (Sigma-Aldrich Company Ltd., Dorset, UK) に FBS を 10% 加えたものを使用した。

HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) は Lonza Japan Ltd (Tokyo, Japan) から購入した。培地は EGM-2 MV complete medium (Lonza Japan Ltd, Tokyo, Japan) を使用した。

培養は CO₂ 5%、温度 37°C、湿潤な環境で行った。低酸素刺激を加える場合は、hypoxic cultivation incubator (Juji Field Co. Ltd., Tokyo, Japan) もしくは IN VIVO2 400 (Baker Ruskinn, Maine, USA) を用いて O₂ 1%、N₂ 94%、CO₂ 5% の環境で培養した。

TGF- β 刺激を加える場合は、Recombinant Human TGF- β (R&D systems, Minnesota, USA) 2 μ g/ml 溶液を培地に加えて、最終濃度を 3ng/ml とした。

3.2 RNA-seq

10cm dish1 枚の HK-2 を PBS で 2 回洗浄し、TRIzol (Life technologies, California, USA) 1ml で回収し、プロパノール沈澱で RNA を精製した。NanoDrop (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) で RNA の濃度と純度を確認した。TruSeq sample purification kit (Illumina Inc, California, USA) を用いて poly A tail を持つ RNA を精製し、Superscript III (Life technologies, California, USA) と oligo dT を用いて poly A tail を持つ RNA を逆

転写した。Nextera XT DNA Sample Preparation kit (Life technologies、California、USA) でライブラリを作り、Illumina GAIix (Illumina Inc、California、USA) を用いて、塩基配列をシングルリードで読んだ。36 bp のショートリードが得られたので、CASAVA 1.7 ソフトウェア(Illumina Inc、California、USA) を用いてヒトゲノムリファレンス(hg19) にマッピングした。

遺伝子の発現量は Reads Per Kilobase per Million mapped reads(RPKM)で表現した。

RPKM は以下の式で計算した。

$$\text{各mRNAのRPKM} = \text{各mRNAのリード数} \times \frac{1000}{\text{各mRNAの長さ(塩基数)}} \times \frac{1000000}{\text{総リード数}}$$

3.3 DNA microarray

10cm dish1 枚の HUVEC から RNA を、RNA-seq と同様の方法で回収した。

ハイブリダイゼーション用のサンプルは GeneChip® 3' IVT PLUS Reagent Kit

(Affymetrix、California、USA) を用いて調製した。オリゴ dT を用いて、ファーストストランドの cDNA を合成し、次いでセカンドストランドを合成した。この cDNA を鋳型に、ビオチンでラベルした cRNA を転写・増幅した。この cRNA をビーズで精製し、ビオチンラベルのない核酸、酵素、塩などを除去した。ラベルされた cRNA のサイズの分布を確認し、Fragment buffer と反応させて、100~120b のサイズが多くなるように調製した。

DNA microarray は Human Genome U133 Plus 2.0 array (Affymetrix、California、USA) を用いた。上記の cRNA と Hybridization mix を混合して、array に注入し Hybridization oven に装着した。Hybridization は 45°C で 16 時間行い、余分な cRNA を洗浄液で除去し、Streptavidin Phycoerythrin 染色、ビオチン化抗体処理、Streptavidin Phycoerythrin での再染色を行い、蛍光を増強した。蛍光を専用スキャナーで読み、MAS5.0 (Affymetrix、California、USA) で画像解析を行った。Array の各プローブが示す信号強度の平均値が 100 になるようにデータを標準化し、これを各プローブが相当する遺伝子の発現量とした。

3.4 クラスタリング

低酸素に置く直前を 0 時間として、低酸素に置いてから 2、4、8、12、24 時間後の遺伝子の発現量を、RNA-seq では RPKM、DNA array では信号強度で表現し、これらの数値を使って Cluster 3.0 (<http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/>) を用いてクラスタリングを行った。

HK-2 については、いずれかの時間で RPKM が 3 以上であった遺伝子 9802 個のみをクラスタリングに用いた。各時間の RPKM を、0 時間の RPKM で割った値を求め、2 を底とする対数を取り、single linkage でクラスタリングを行った。

HUVEC については、いずれかの時間で信号強度が 500 以上であったプローブ 10099 個 (遺伝子 6884 個) のみをクラスタリングに用いた。各時間の信号強度を、0 時間の

信号強度で割った値を求め、2 を底とする対数を取り、single linkage でクラスタリングを行った。

クラスタリングの結果は、Java Treeview (<http://jtreeview.sourceforge.net/>) を用いて表示した。

3.5 Gene annotation

HK-2 は RNA-seq の RPKM 値を、HUVEC は DNA microarray の信号強度を用いて解析を行った。クラスタリングと同じく、HK-2 については、いずれかの時間で RPKM が 3 以上であった遺伝子 9802 個、HUVEC については、いずれかの時間で信号強度が 500 以上であったプローブの遺伝子 6884 個を解析した。2 から 24 時間の各時間で、0 時間に対して RPKM もしくは信号強度が初めて 2 倍を越えた遺伝子をリストにした。

各時間の遺伝子リストを、DAVID Bioinformatics Resources 6.7

(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) に投入した。Species は、Homo sapiens を選択し、Gene ontology の GOTERM_CC_FAT の項目から annotation の Term、p 値、合致した遺伝子のリストを得た。

3.6 定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR)

DNA サンプルの定量は qPCR を用いた。1 well あたり $0.2 \mu\text{l}$ の DNA サンプルを PCR の鋳型とした。PCR 反応液は最終濃度が KCl 5mM、Tris-HCl 1mM、MgCl₂ 0.2mM、ゼラチン 0.001%、dNTP 0.2mM、各プライマー $0.2 \mu\text{M}$ 、Taq ポリメラーゼ溶液 2%、

SYBR Green I 溶液 0.003%になるように調製し、DNA サンプルも含めて 1 well あたり合計が 25 μ l になるよう蒸留水で希釈した。使用したプライマーは、下記の実験ごとに記載する。PCR 反応は、まず熱変性を 94°C で 3 分間行い、その後、[熱変性を 94°C で 20 秒間、アニーリングを 59°C で 20 秒間、伸長反応を 72°C で 20 秒間] を 1 サイクルとして、40 サイクル行った。

3.7 クロマチン免疫沈降 (ChIP) -seq

HK-2 もしくは HUVEC の培地 10ml あたりホルマリン (37%ホルムアルデヒド溶液) 270 μ l を加えて、室温で 10 分間振盪してクロマチンを架橋し、さらに 2.5M グリシン 500 μ l を加えて、室温で 5 分間振盪してホルマリンを中和した。dish を PBS で 2 回洗浄し、ラバーブレードで細胞を回収し、遠心して上清を捨て、細胞のペレットを得た。Protease inhibitor を加えた Nuclear lysis buffer (Tris-HCl (pH 7.5) 10 mM、NaCl 200 mM、EDTA 10 mM、SDS 1 %) 100~600 μ l をペレットに加え、氷上もしくは 4°C に 10 分以上おいて、クロマチンを抽出した。超音波細胞破碎装置 UD-201 (Tomy Seiko、Tokyo、Japan) もしくは Picoruptor (Diagenode、Seraing、Belgique) でクロマチンを断片化し、300~600 bp の DNA が多く含まれるようにサンプルを調製した。15000g、4°C、15 分間で遠心し、上清を回収してクロマチン溶解液を得た。IP buffer (Tris-HCl(pH 8.0) 20mM、EDTA(pH 8.0) 2mM、NaCl 150mM、TritonX 1%、SDS 0.1%) で 10 倍に希釈し、50%のセファロースビーズ A、G (GE Healthcare UK、Buckinghamshire、UK) を 20~40 μ l ずつ添加して非特異的吸着物質を除去した。この時点でクロマチン溶解液 100

μ l を分注し、Input サンプルとした。クロマチン溶解液をさらに 1000 μ l 分注し、免疫沈降用の抗体を加えた。抗体は、抗 HIF-1 α 抗体 NB100-134 (Novus Biologicals, Colorado, USA) 4 μ g、もしくは抗 SMAD3 抗体 AF3797 (R&D systems, Minnesota, USA) 2 μ g を用いた。抗体を加えたクロマチン溶解液を、チューブに入れ 4°C で一晩回転させ、クロマチンと抗体を結合させた。50% のセファロースビーズ A、G を 20 μ l ずつ加え、4°C で 2 時間回転し、ビーズと抗体を結合させた。遠心して上清を除去し、クロマチン、抗体、ビーズの複合体を得た。この複合体を IP buffer、洗浄バッファで洗浄し、精製した。洗浄後、溶出バッファ 100 μ l、プロナーゼ 3 μ g を加え、42°C で 2 時間反応させクロマチンに含まれる蛋白質を分解し、その後 65°C に 6 時間以上置いて脱架橋し、DNA 溶液を回収した (以下、これを ChIP の DNA サンプルと呼ぶ)。前日回収した Input サンプルもプロナーゼを加えて同様に反応させ、Input の DNA サンプルを回収した。ChIP の DNA サンプルおよび Input の DNA サンプルは、QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて DNA 以外の不純物を除去した。

ゲノム上の目的の DNA が ChIP で濃縮したか、ChIP と Input の DNA サンプルを用いて、qPCR で確認した。HIF-1 α 抗体については JMJD1A 遺伝子近傍の配列を、SMAD3 抗体については SERPINE1 遺伝子近傍の配列を濃縮確認に用いた。ネガティブコントロールとして、それぞれ、VEGF 遺伝子近傍、HPRT1 遺伝子近傍の配列を用いた。qPCR のプライマーはそれぞれ下記のものを用いた。

JMJD1A_ChIP_F1	5'-CTTTCCTGTGAGATTCTTCCGCCA-3'
----------------	--------------------------------

JMJD1A_ChIP_R1	5'-CCGCGAAATCGGTTATCAACTTTGGG-3'
VEGF_ChIP_F1	5'-TGAGGGTTCATCAAGCTGGTGTCT-3'
VEGF_ChIP_R1	5'-TTGGAGAGGGCAGTGCTTAACTCA-3'
SERPINE1_ChIP_F5	5'-ACTGTATCACCCAGACGGCT-3'
SERPINE1_ChIP_R5	5'-AGGTGTCCAGAGAGACGGTG-3'
HPRT1_ChIP_F1	5'-TGTTTGGGCTATTTACTAGTTG-3'
HPRT1_ChIP_R1	5'-ATAAAATGACTTAAGCCCAGAG-3'

ChIP-seq のデータを得るため、濃縮が確認された ChIP の DNA サンプルを以下のよ
うな手順で次世代シーケンサー Illumina GAIIx で解析した。シーケンス用ライブラリ
の作成や Illumina GAIIx での解析は既報[13]を参考にした。

シーケンス用ライブラリを下記の手順で作成した。まず、上記の ChIP の DNA サン
プルの末端に terminal transferase でアデニンを付加した。これを MinElute PCR
purification Kit (Qiagen、Hilden、Germany) で精製し、2%アガロースゲルで 100V の泳
動を 70 分間行い、それぞれ $300 \pm 25\text{bp}$ 、 $400 \pm 25\text{bp}$ 、 $500 \pm 25\text{bp}$ に相当する部位を切
り出し、QIAGEN Gel Extraction Kit (Qiagen、Hilden、Germany)で精製し各サイズの DNA
サンプルを得た。DNA サンプルを鋳型に、PCR を 18 サイクル (98°C 10 秒間、65°C
30 秒間、72°C 30 秒間で 1 サイクル) 行い、再び MinElute PCR purification Kit で精製
し、シーケンス用ライブラリを得た。

ライブラリをバイオアナライザ (Agilent Technologies、California、USA) で解析し、
DNA の有効濃度とサイズを確認した。また $300 \pm 25\text{bp}$ 、 $400 \pm 25\text{bp}$ 、 $500 \pm 25\text{bp}$ のサ
イズごとに qPCR を行い、上記と同じ配列を用いて濃縮を確認した。

選択されたサイズのライブラリは Illumina GAIIx を用いて、塩基配列をシングルリ
ードで読んだ。36 bp のショートリードが得られたので、CASAVA 1.7 ソフトウェア

(Illumina Inc, San Diego, California, USA) を用いてヒトゲノムリファレンス(hg19) にマッピングした。このようにして得たシーケンス配列を MACS プログラム(バージョン 1.3.7.1) で統計学的に検定し[14]、まずは p 値 $<1e-5$ の領域をピーク (HIF-1 α もしくは SMAD3 の結合部位) と判定した[14]。MACS のパラメータは、--tsize を” 36” に、--gsize を” 186550000” に、--mfold を” 10” に、--nomodel、--nolambda、--wig に設定した。ピークごとに p 値を計算し、実際の解析では p 値 $<1e-30$ 以下のピークのみを有意なものとした。またシーケンス配列の可視化には IGB (Integrated Genome Viewer, Affymetrix)を用いた[15]。

3.8 箱ひげ図

低酸素 24 時間で HIF-1 α の結合が TSS から 500bp 以内にある遺伝子と、それ以外の遺伝子で、0 時間と 24 時間の発現の比を箱ひげ図で表した (図 7)。HK-2 については 0 時間の RPKM が 1 以上の遺伝子を、HUVEC については 0 時間の信号強度が 500 以上のプローブを選択して解析した。

3.9 Motif analysis

ChIP-seq で同定した結合領域の Motif analysis を行った。O₂ 1%に 24 時間置いた HK-2 と HUVEC の HIF-1 α 結合領域のうち、p 値 $<1e-5$ かつ fold-enrichment 30 以上の領域は HK-2 で 713 か所、HUVEC で 442 箇所であり、HK-2 のみに含まれるものは 532 か所であった。これらの結合領域の頂点の前後 150bp (合計 300bp) の DNA 配列を抽出し、

DME (The Discriminating Matrix Enumerator) (<http://rulai.cshl.edu/dme/>) を用いて同領域に濃縮する特徴的な転写因子の認識配列を抽出した[16]。DME アルゴリズムのパラメータは、-z (ZOOPS model)、-n= 100、-w= 8 or 12 とした。DME で抽出した候補を、STAMP (<http://www.benoslab.pitt.edu/stamp/>) を用いて転写因子モチーフのデータベースである TRANSFAC (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html>) と比較し[17]、p 値が 1.0×10^{-6} 未満の良く似た配列を選択した[18]。また上記とは別に、特定の領域の DNA 配列と様々な転写因子の認識配列がどれほど一致するか調べるために、TRAP (Transcription factor affinity prediction) (<http://trap.molgen.mpg.de/cgi-bin/home.cgi>) を利用した[19]。

3.10 ChIP-seq Enrichment Site Map

HK-2 の ChIP-seq の data を用いて、HIF-1 α と SMAD3 の共局在を図で表現した。低酸素刺激後の HIF-1 α の結合部位 713 箇所について、前後 5kbp の範囲を 100bp ずつの領域に区分し、それぞれの領域における SMAD3 の分布を MACS 値の最小値で代表して表わした。MACS 値が 10^{-10} 以下を黒で、MACS 値が $10^{-0.03}$ 以上を白で、その中間は灰色の階調で表現した。

3.11 ChIP-qPCR

DNA 精製までは、ChIP-seq と同じ手順で行った。標的領域の濃縮を確認するため、ChIP と Input の DNA サンプルを用いて qPCR を行った。手順は 2.6 の qPCR と同じ方

法を用い、プライマーは下記のものを使った。非濃縮域の標的として、HPRT1 近傍の領域を用いた。

SERPINE1_ChIP_F7	acatgcaagaagcctgctcc
SERPINE1_ChIP_R7	cagcatgcccagagtcactg
COL1A1_ChIP_F1	tcctccagtcoccatgatggc
COL1A1_ChIP_R1	gcgacttgagtcaccaggtc
IGFBP3_ChIP_F1	ccggtgacagtggtggttgtc
IGFBP3_ChIP_R1	gctcccgcttgcttaactct
HPRT1_ChIP_F1	tgtttgaggctatctactagttg
HPRT1_ChIP_R1	ataaaatgacttaagcccagag

3.12 small interfering RNA (siRNA)

細胞は HK-2 を使った。3.1 で使った培地は抗生剤を含んでいないので、同じものを用いた。10cm dish の HK-2 を用意し、サンプル回収時にほぼコンフルエントとなるように継代した。HIF1A の siRNA に Stealth RNAi (Life technologies、California、USA) の HSS104775 を、control に Stealth RNAi Negative Control Duplex (Life technologies、California、USA) の Medium GC Duplex を用いた。それぞれの Stealth RNAi (20pmol/ml) を Opti-MEM (Life technologies、California、USA) 500 μ l で希釈した。また Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Life technologies、California、USA) 10 μ l を Opti-MEM 500 μ l で希釈した。Stealth RNAi と Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent の希釈液を 500 μ l ずつ混合して 1ml とし、室温に 20 分置いた。その間に、細胞の培地を捨て、新し培地を 4ml 加えた。先ほどの siRNA の溶液 1ml を加えて、合計 5ml とし、培養器に入れた。24 時間後にサンプルを回収、もしくは培地交換したり、各種刺激(低酸素、TGF- β など) を加えたりした。

3.13 ウェスタンブロッティング

10cm dish コンフルエントの HK-2 を PBS で洗浄し、ラバーブレードで回収した。上清を除いて、HLB buffer (HEPES/KOH (pH 7.9) 10mM、KCl 10mM、MgCl₂ 1.5ml、DTT 0.5mM、Protease inhibitor) 100 μ l を加えて、細胞質を除去し、遠心して核分画を得た。さらにこの核分画を HLB buffer 100 μ l で2回洗浄した。この核分画を RIPA buffer (Tris-HCl(pH8.0)50mM、sodium chloride 150mM、sodium deoxycholate 0.5%、sodium dodecyl sulfate 0.1%、NP-40 substitute 1%) で溶解し、遠心して上清を回収し、蛋白質のサンプルを得た。

各蛋白質のサンプル 10 μ l と SDS サンプル buffer (Tris-HCl (pH 6.8) 125mM、sodium dodecyl sulfate 4%、スクロース 10%、BPB 0.01%、2-メルカプトエタノール 10%) 10 μ を混合して、95°Cに 5 分おいた。12% SDS polyacrylamide ゲルの各レーンにサンプル 15 μ をロードし、電気泳動を行った。PVDF メンブレンに転写して、2%スキムミルクでブロッキングして、抗 HIF-1 α 抗体 (NB100-134、1mg/ml を 5000 倍希釈) もしくは抗 NP62 抗体 (BD 610498、150 μ g/ml を 2500 倍希釈) で室温 1 時間の一次抗体反応を行った。メンブレンを TBST で洗浄の後、それぞれ HRP 標識抗ラビット IgG 抗体(NA9340V、GE Healthcare UK、Buckinghamshire、UK)を 5000 倍希釈または HRP 標識抗マウス IgG 抗体(NA931V、GE Healthcare UK、Buckinghamshire、UK)を 2500 倍希釈し、二次抗体反応を行った。二次抗体反応を行ったメンブレンは、ECL Plus

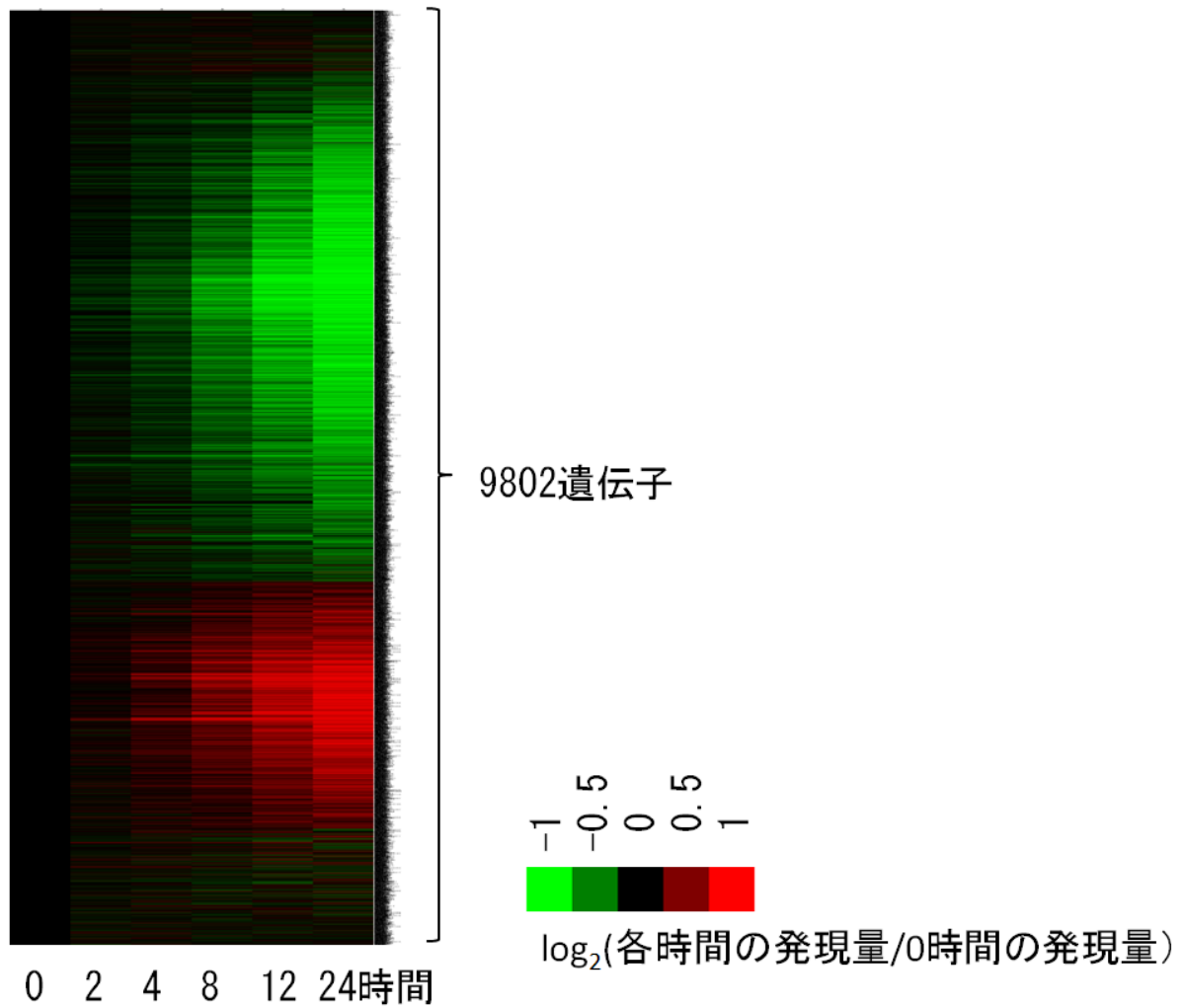
Western Blotting Detection System (GE Healthcare UK、 Buckinghamshire、 UK) を用いて
化学発光させ、 LAS3000UV (FUJIFILM、 Tokyo、 Japan) で撮影した。

第4章 結果

4.1 低酸素刺激による遺伝子発現の変化の網羅的解析

低酸素による遺伝子発現の変化が細胞特異的であるか確認するため、HK-2 および HUVEC を低酸素 (O_2 1%) で刺激して、遺伝子発現の変化を経時的に調べた。低酸素刺激前、刺激 2 時間、4 時間、8 時間、12 時間、24 時間の 6 つの時点で RNA を採取し、HK-2 は RNA-seq を、HUVEC は DNA microarray を用いて、遺伝子発現をゲノムワイドに調べた。誤差を抑えるため、遺伝子の発現量が少ない遺伝子、信号強度が低いプローブは除外した。除外の条件は、RNA-seq については発現量が RPKM (reads per kilobase per million mapped sequence reads) で 3 未満の遺伝子、DNA array については標準化した信号強度が 500 未満のプローブとした。この条件で、それぞれ 9802 遺伝子、10099 プローブ (6884 遺伝子) が条件を満たした。これらの遺伝子、プローブを Cluster 3.0 でクラスタリングし、Java Treeviewer で可視化した (図 3、4)。

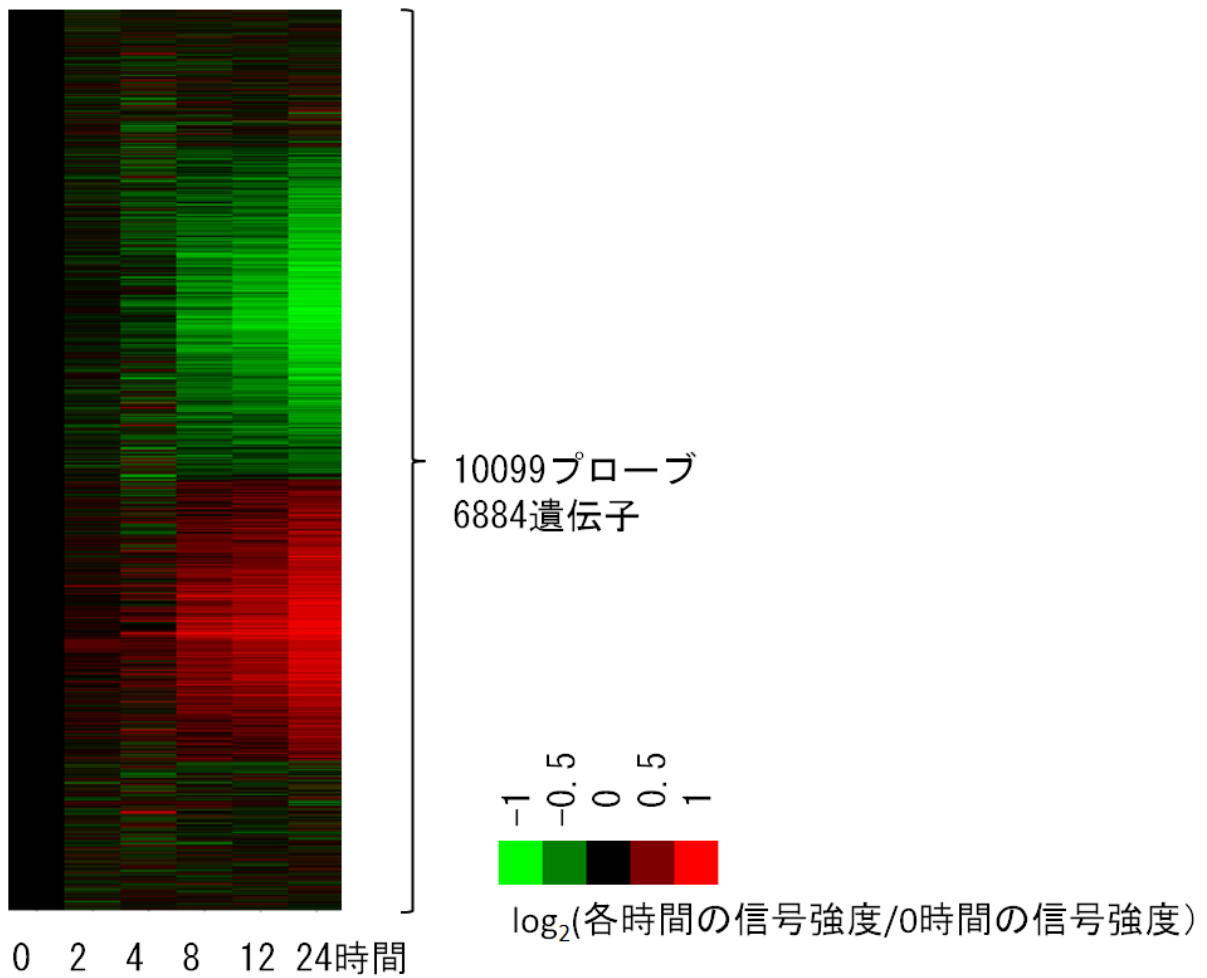
発現量の変化は、多くの場合、一方向であり、増加するものは連続的に増加し、減少するものは減少した。ただし、変化の速度は遺伝子ごとに異なっており、低酸素刺激の直後から増加もしくは減少する遺伝子がある一方で、24 時間後によく変化が明らかになる遺伝子もあった。それぞれの時間で変化した遺伝子の働きについては、次項で確認した。



(図 3) 低酸素による HK-2 の遺伝子発現の変化(RNA-seq)

いずれかの時間で RPKM>3 を満たす遺伝子のみクラスタリングした。

低酸素刺激によって発現が増加する遺伝子と減少する遺伝子があり、多くの場合、変化は一方向性であった。



(図 4) 低酸素による HUVEC の遺伝子発現の変化(DNA array)

いずれかの時間で $\text{signal} > 500$ を満たすプローブのみを採用した。

HK-2 と同様に、多くの場合、変化は一方向性であった。

4.2 低酸素刺激後、各時間に増加した遺伝子の annotation

低酸素によって発現が増加した遺伝子が、いかなる生理学的反応と関係しているのか調べるため、4.1 でクラスタリングした遺伝子（HK-2 は 9802 個、HUVEC は 6884 個）について、Gene annotation を行った。2 時間、4 時間、8 時間、12 時間、24 時間のそれぞれの時間で発現量（HK-2 では RPKM、HUVEC ではプローブの信号強度）が 0 時間に比べて初めて 2 倍を越えた遺伝子の個数は、それぞれ HK-2 で 19 個、53 個、131 個、242 個、431 個、HUVEC で 39 個、144 個、330 個、200 個、760 個であった。

それぞれの遺伝子の集合、計 10 組を DAVID で annotation したところ、下記のような結果が得られた（表 1、2）。最初期の 2 時間で上昇する遺伝子の annotation は、「response to hypoxia」が HK-2 と HUVEC で共通していた。一方で、特定の細胞にしかな出現しない Term もあり、HK-2 の 24 時間には「epidermal growth factor receptor signaling pathway」、HUVEC の 4 時間には「blood vessel development」があった。また、同じような意味の Term でも出現する時間が異なっているものもあり、例えば解糖系に関する Term（「hexose metabolic process」、「glycolysis」）は、4 時間では両者にみられるが、その後の時間では、HK-2 は 8 時間と 12 時間のみ、HUVEC は 24 時間のみしか出現しない。HK-2 については「apoptosis」、「regulation of cell motion」など腎障害との関連が考えられる Term も出現した。

	Term	p 値	Genes
2 時間	response to hypoxia	0.0673	ADM, DDIT4
4 時間	hexose metabolic process	0.0004	PPP1R3E, PPP1R3C, PFKFB4, HK2, ENO2
	reproductive process in a multicellular organism	0.0115	SLC2A14, VEGFA, HK2, APLN, GAL3ST1
	response to hypoxia	0.0252	VEGFA, EGLN3, ANGPTL4
8 時間	hexose metabolic process	0.0053	PDK1, GBE1, PPP1R3B, PFKFB3, HK1, PGK1
	response to hypoxia	0.0078	CA9, EPAS1, ANG, PLOD2, BNIP3
	positive regulation of myoblast differentiation	0.0289	BTG1, IGFBP3
	tissue remodeling	0.0423	ELF3, EPAS1, CSPG4
12 時間	positive regulation of kinase activity	0.0095	LRP1, VAV3, KIAA1804, EDN2, TGFA, ADAM9, VLDLR, FGD4
	regulation of cell-substrate adhesion	0.0115	BCL2, COL8A1, PIK3R1, SPP1
	glycolysis	0.0121	GPI, PGM1, OGDHL, PGAM2
	apoptosis	0.0202	RNF144B, VAV3, TNFRSF14, BIRC3, DAPK1, SEMA6A, TSC22D3, MOAP1, BCL2, NEK6, FGD4, KALRN, TP53INP1
	regulation of cell migration	0.0295	IRS2, BCL2, EDN2, VASH1, PIK3R1, ADAM9
24 時間	negative regulation of growth	0.0010	ING4, DAB2, CDKN2D, NPPB, BCL6, PTCH1, TGFB1, SERTAD2, ENO1
	epidermal growth factor receptor signaling pathway	0.0016	EGFR, CAMLG, GAB1, GRB7, TGFB1
	regulation of cell motion	0.0032	EGFR, PTPRM, SERPINE2, GAB1, SCAI, PAX6, BCL6, IL6R, HDAC9, LAMB1, TGFB1
	negative regulation of cell growth	0.0071	DAB2, CDKN2D, NPPB, BCL6, TGFB1, SERTAD2, ENO1
	response to hypoxia	0.0122	KCNMA1, ATP1B1, NOL3, SMAD9, ITPR1, DPP4, PLAU, TGFB1

(表 1) HK-2 の Gene annotation

それぞれの時間で初めて、RPKM が 0 時間に比べて 2 倍を越えた遺伝子について、DAVID を用いて注釈を行った。重複する意味の Term は除外し、annotation の一部を記載した。

	Term	p 值	Genes
2 時間	response to hypoxia	0.0023	HSP90B1, ADM, DDIT4, ANGPTL4
	blood vessel development	0.0125	RECK, JAG1, COL1A1, ANGPTL4
	histone modification	0.0244	HDAC5, MLL5, BRPF3
4 時間	blood vessel development	0.0000	VEGFC, CDH13, CXCR4, SMAD7, DLL4, LEPR, VEGFA, EDN1, APOLD1, LOX, JUNB
	hexose metabolic process	0.0004	PDK1, PPP1R3C, PFKFB4, PFKFB3, PGM1, HK2, ENO2, ENO1
	regulation of locomotion	0.0004	VEGFC, CDH13, ADORA2A, CXCR4, SMAD7, DLL4, VEGFA, EDN1
	response to hypoxia	0.0025	CXCR4, VEGFA, EDN1, APOLD1, BNIP3, EGLN1
8 時間	negative regulation of transcription	0.0009	SATB1, ING4, GLIS2, RXRA, TAF9B, ZHX2, LMCD1, CBFA2T2, TCF7L1, CDKN1C, ATXN1, HEXIM2, PHF21A, ZNF496, KDM5B, MYST4, KDM6B
	response to endogenous stimulus	0.0019	BCKDHA, RXRA, ALDOC, BAIAP2, PTGS1, FOXO1, AQP1, UBE2B, TIMP3, IGF1R, ANG, MGEA5, ARSA, SORT1, INSR
	response to hypoxia	0.0121	NOL3, ANG, PLOD2, ALDOC, HIF3A, UBE2B, ITPR2
	response to oxygen levels	0.0153	NOL3, ANG, PLOD2, ALDOC, HIF3A, UBE2B, ITPR2
12 時間	enzyme linked receptor protein signaling pathway	0.0140	TXNIP, BMP4, MTSS1, IRS2, FLT1, PTPRF, COL1A2, TFG, PLEKHA1
	actin cytoskeleton organization	0.0184	MTSS1, KRT19, ACTC1, WASF2, WASL, FLNB, TTLL3
	cell motion	0.0732	ICAM1, MTSS1, PLXNA3, PTPRM, FLT1, ARHGEF7, SPINT2, WASF2, WASL
24 時間	regulation of cell motion	0.0000	DLC1, COL18A1, JUB, PLD1, PARD3, SP100, PDGFB, INS-IGF2, BCAR1, ACTN1, IGF2, PTEN, TGFB1, TGFB2, PRR5, NISCH, ETS1, CXCL16, MAP3K1, RRAS, BCL6, LAMB1, ARHGAP8, ARAP1
	actin filament-based process	0.0000	DLC1, ALDOA, CXCL1, INF2, PDLIM7, NUA2, PDGFB, EPB41, BCAR1, ACTN1, EVL, MYH9, CALR, FLNA,

		PRR5, NISCH, MYL6B, GSN, LIMCH1, BCL6, ARHGAP8, FGD6, EHD2, ARAP1
response to oxygen levels	0.0003	CCL2, PDGFB, SMAD4, PDLIM1, MMP2, TGFB1, ARNT, SOD2, TGFB2, EP300, ALAS2, PLOD1, CAMK2D, ALDH2, CABC1
hexose metabolic process	0.0009	ALDOA, PFKL, INS-IGF2, PFKP, IGF2, FUCA1, PMM1, GPI, PGLS, TPI1, PPP1R3B, NISCH, MAN2B2, H6PD, PYGL, GAA, PGK1, MAN2B1
angiogenesis	0.0123	NRP2, COL18A1, GPI, IL8, NOTCH4, MMP19, ZC3H12A, PLCD1, MYH9, TNFAIP2, PTEN, TGFB2

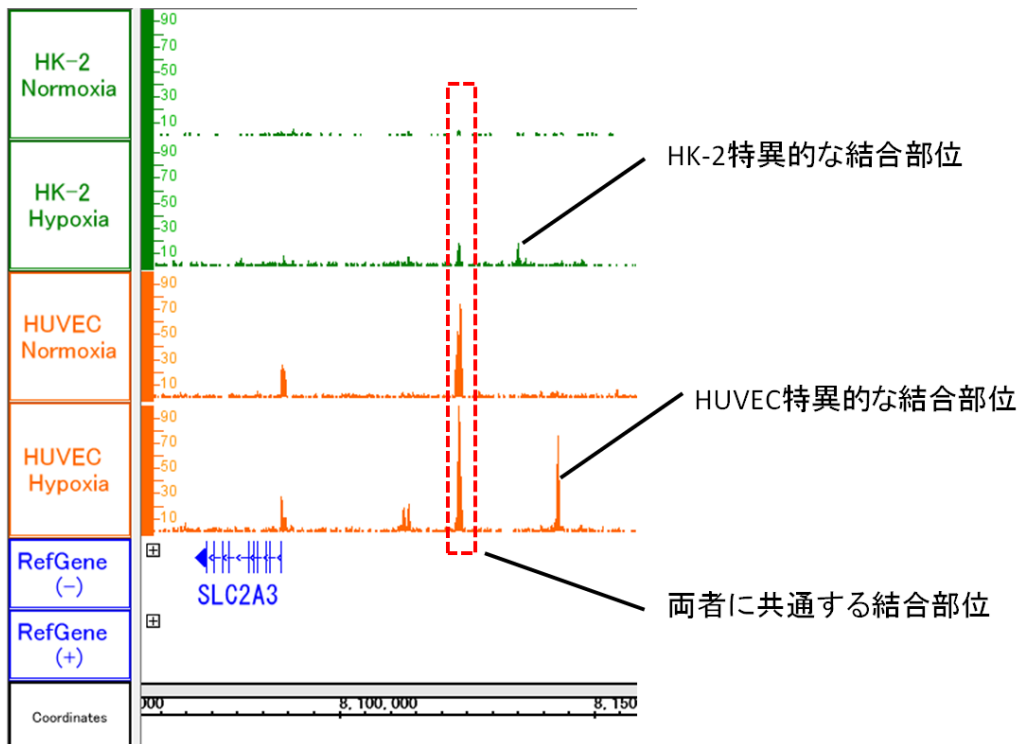
(表 2) HUVEC の Gene annotation

それぞれの時間で初めて、信号強度が 0 時間に比べて 2 倍を越えたプローブが示す

遺伝子について、DAVID を用いて注釈を行った。annotation の一部を記載した。

4.3 ChIP-seq による HIF-1 α の細胞特異的な転写制御の網羅的解析

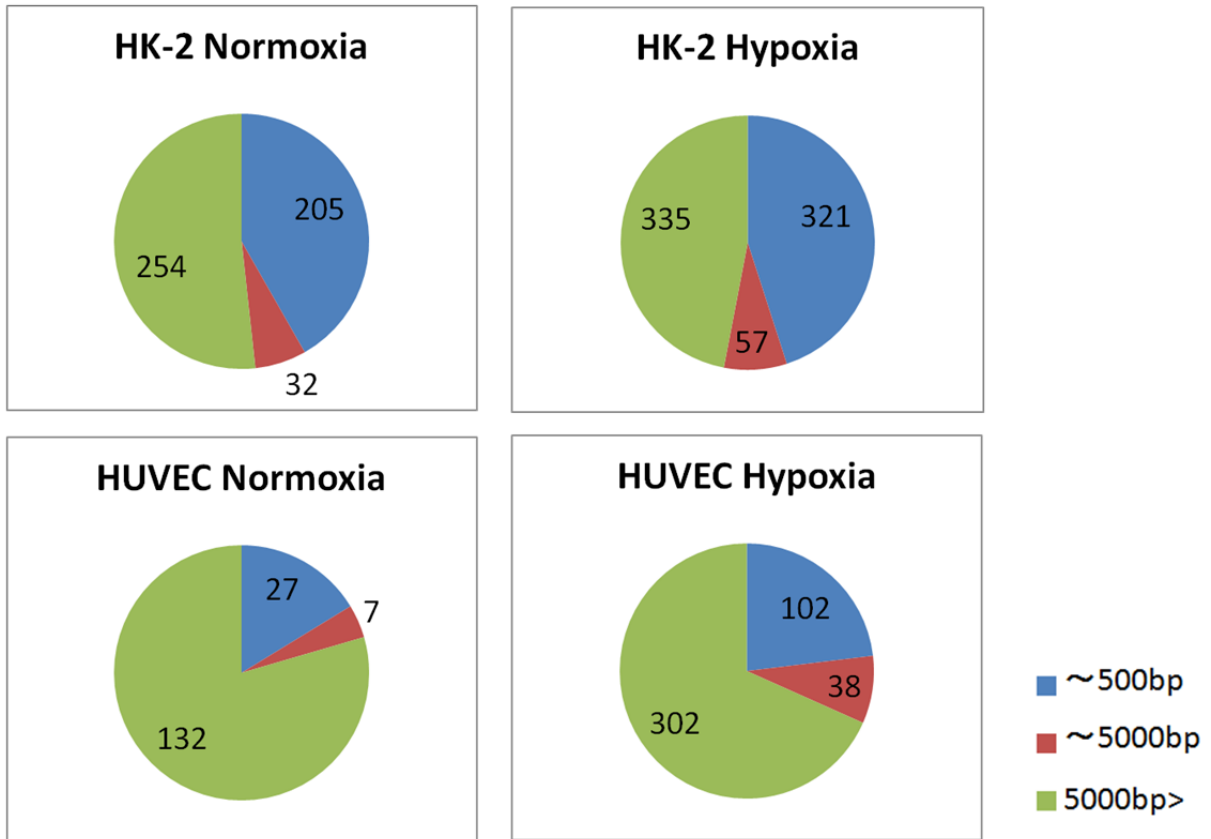
低酸素に対する遺伝子発現の変化の細胞特異性は、低酸素における重要な転写因子である HIF-1 α と関係しているのではないかと推測した。これを確認するため、HK-2 と HUVEC それぞれについて、低酸素刺激前、低酸素 (O₂ 1%) 刺激 24 時間後の 2 条件で HIF-1 α の ChIP-seq を行い、HIF-1 α とゲノムの結合を網羅的に調べた。解析したデータは、閲覧用のソフトウェア IGB 7.0.4 を用いて可視化した。その一部、遺伝子 SLC2A3 の周辺を示す(図 5)。HK-2 と HUVEC に共通する結合部位がある一方で、それぞれの細胞に特異的な結合部位もあった。また低酸素刺激によって HIF-1 α の新たな結合部位が出現し、その逆に、低酸素刺激による結合部位の消失はほとんど認められなかった。



(図 5) HK-2 と HUVEC における HIF-1 α の結合部位

HK-2 と HUVEC を用いて、通常酸素と低酸素(O₂ 1%) 刺激 24 時間の 2 条件で HIF-1 α の ChIP-seq を行った。HIF-1 α のゲノム上における結合部位が、グラフでピークとして表現されている。

HIF-1 α の結合部位に細胞特異性があるか確認するため、それぞれの細胞で、HIF-1 α の結合部位を刺激の前後で数えた (図 6)。いずれの細胞でも低酸素刺激によって、結合部位が増加した。HK-2 については、結合部位の半数弱が transcription start sites (TSS) の 500bp 以内に存在し、その割合は低酸素刺激の前後であまり変化しなかった。HUVEC については、結合部位の約 2 割が transcription start sites (TSS) の 500bp 以内に存在し、その割合は低酸素刺激の前後であまり変化しなかった。

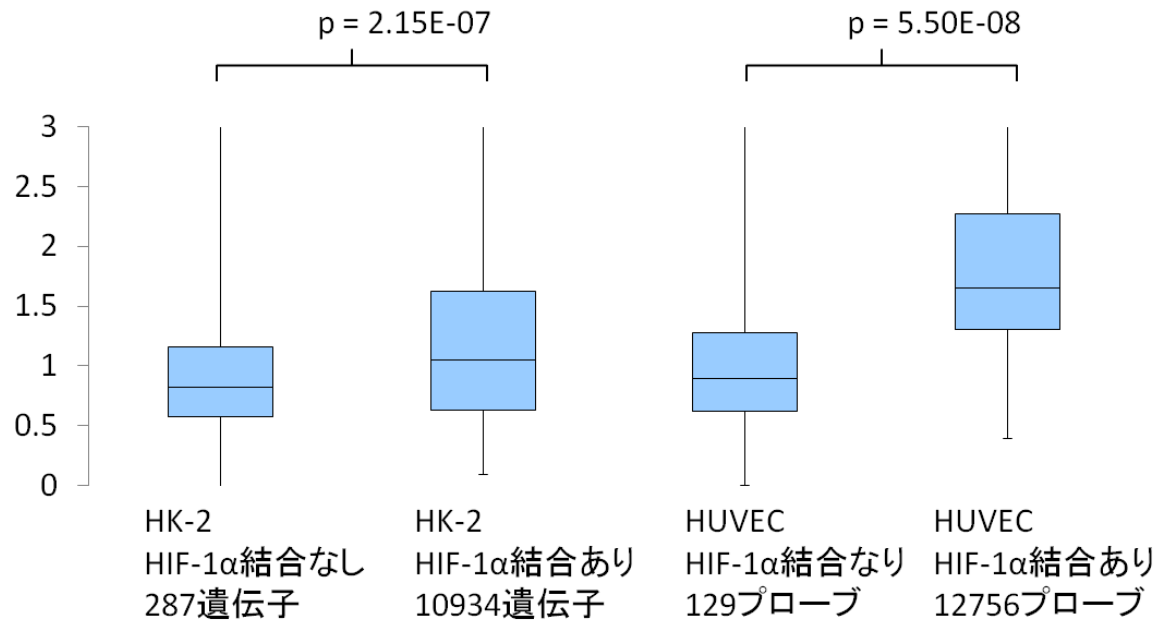


(図 6) HIF-1 α の結合部位から TSS までの距離の分布 (ChIP-seq)

MACS p 値 $<10^{-5}$ かつ fold-enrichment 30 以上の条件で、HIF-1 α の結合部位を抽出した。また結合部位と transcription start sites (TSS) の距離の分布も調べた。

ChIP-seq の結果が妥当であれば、HIF-1 α が近傍に結合している遺伝子は、そうでない遺伝子に比べ、低酸素で発現が上昇する傾向にあると予想される。実際に確認したところ、HK-2、HUVEC とも HIF-1 α が近傍に結合している遺伝子は、そうでない遺伝子に比べ、低酸素刺激によって発現が上昇する傾向を認めた (図 7)。この傾向は HUVEC のほうが顕著であった。

Gene expression (24時間/0時間)

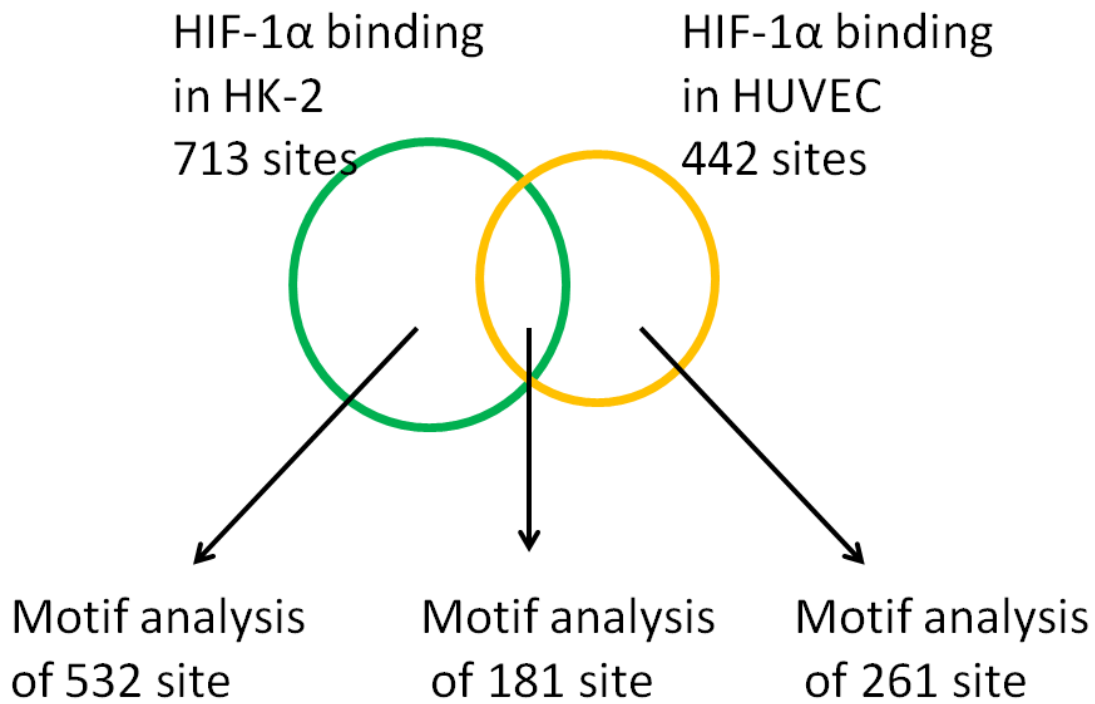


(図 7) 遺伝子発現の変化と HIF-1 α の結合の有無

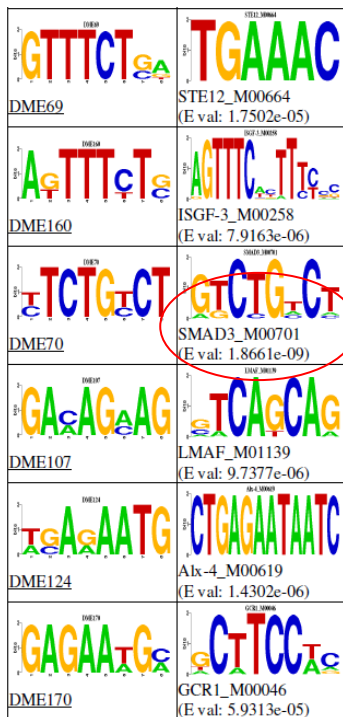
低酸素 24 時間と 0 時間の遺伝子発現の比を、低酸素 24 時間の HIF-1 α の結合の有無で場合分けした。

HK-2 と HUVEC の結合部位の一部は共通していた (図 8 A)。HK-2 に特異的な 532 か所について Motif analysis を行い、DME で 8bp の長さの配列を複数抽出した。これらの配列の中には、SMAD3 の認識配列に良く一致する配列も含まれていた (図 8 B、C)。序文で述べたように、HIF-1 α と SMAD3 は腎障害と関係する重要な転写因子である。図 8 の結果は、尿細管上皮細胞において HIF-1 α と SMAD3 が共局在していることを示唆するものであり、低酸素と TGF- β が転写因子レベルで協調的に作用しているのではないかと予想し、以下の実験を行った。

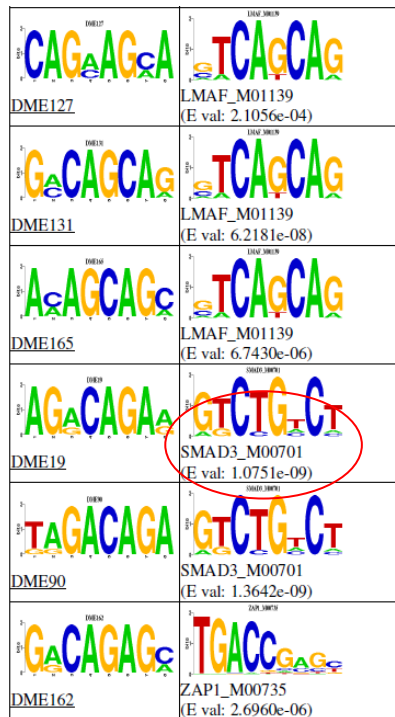
A



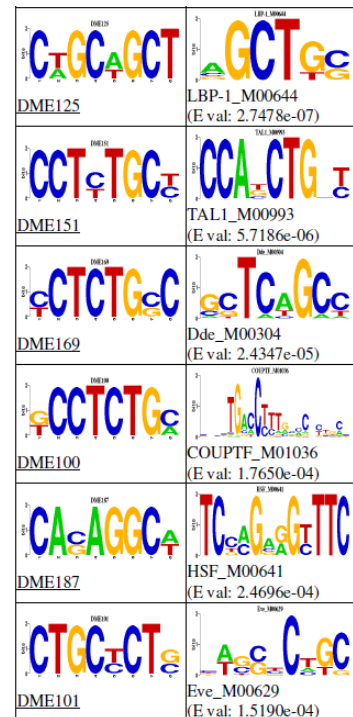
B



C



D



(図 8) HK-2 と HUVEC の HIF-1 α の結合部位の解析

A. HK-2 と HUVEC における HIF-1 α の結合部位の数

低酸素刺激後の HIF-1 α の結合部位の数をベン図で表した。

B. HK-2 特異的な HIF-1 α 結合部位の Motif 解析

HK-2 特異的な HIF-1 α 結合部位の塩基配列を抽出して、Motif 解析を行った。

左の列が DME によって抽出された Motif であり、右の列は、その Motif に最も合致する認識配列の転写因子を TRANSFAC のデータベースから選んだものである。

SMAD3 の認識配列によく一致した配列も抽出された。

C. HK-2、HUVEC に共通する結合部位の Motif 解析

この領域でも、SMAD3 の認識配列によく一致した配列も抽出された。

D. HUVEC 特異的な HIF-1 α 結合部位の Motif 解析

この領域では、SMAD3 の認識配列に良く一致する配列は、Motif 解析の上位 200 に含まれなかった。

DMEによる解析でHIF-1 α の結合領域にSMAD3の認識配列が濃縮していることが確認された。この結果を補強するため、別の解析ソフトであるTRAPを用いて、HK-2 特異的なグループ、HUVEC 特異的なグループ、両者に共通するグループ、それぞれにおいて、SMAD3の認識配列がどれほど集積しているか調べた。SMAD3の認識配列であるV\$SMAD_Q6_01 (図9)と最もよく一致していたのは、HK-2に特異的なグループであった(表3)。



(図 9) V\$SMAD_Q6_01 の配列ロゴ

TRANSFAC のデータから引用した SMAD3 の認識配列である。

1 種類の塩基が占める割合が大きいほど、文字が大きく表示される。

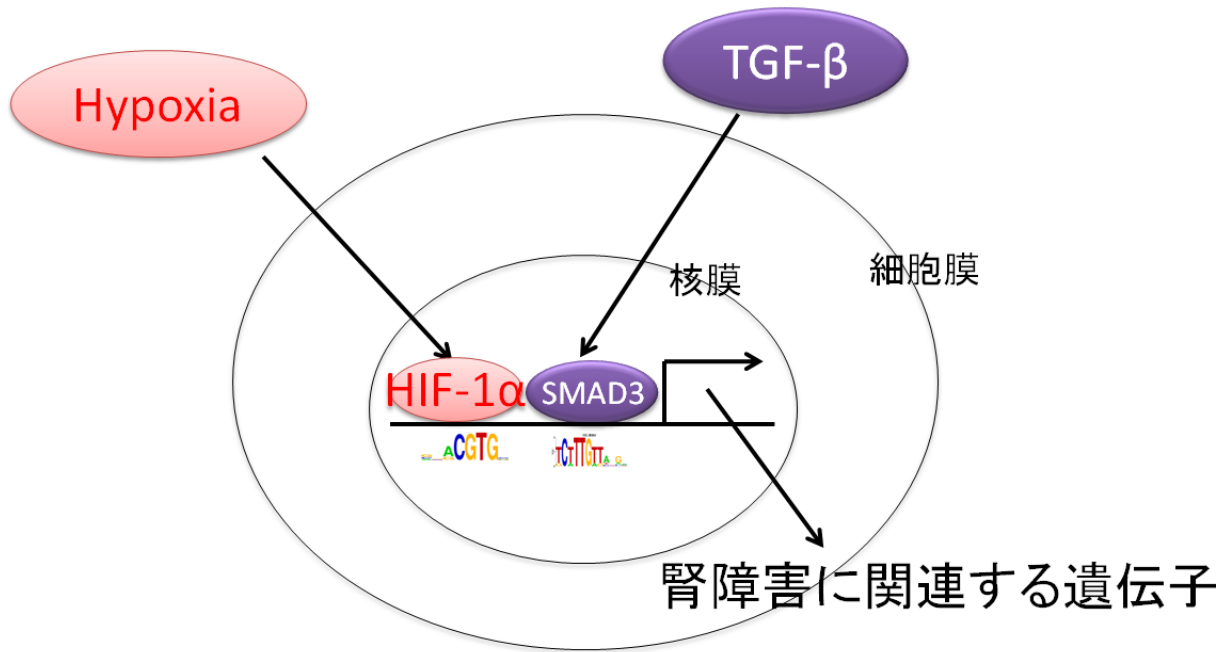
	p 値 (V\$SMAD_Q6_01 との比較)
HK-2 特異的な部位	0.000453
HUVEC 特異的な部位	0.00114
共通する部位	0.0894

(表 3) TRAP による HK-2 特異的、HUVEC 特異的、および両者に共通する HIF-1 α の結合部位と SMAD3 認識配列の類似性の比較

TRAP を用いて (図 8A) の各領域と V\$SMAD_Q6_01 を比較した。

HK-2 特異的な部位が最も V\$SMAD_Q6_01 と一致していた。

以上の結果から、HIF-1 α と SMAD3 がゲノム上の近傍に結合し、その部位の制御下にある遺伝子を協調的に制御しているのではないかと予想した (図 10)。この仮説が正しいか調べるため、次項の実験を行った。



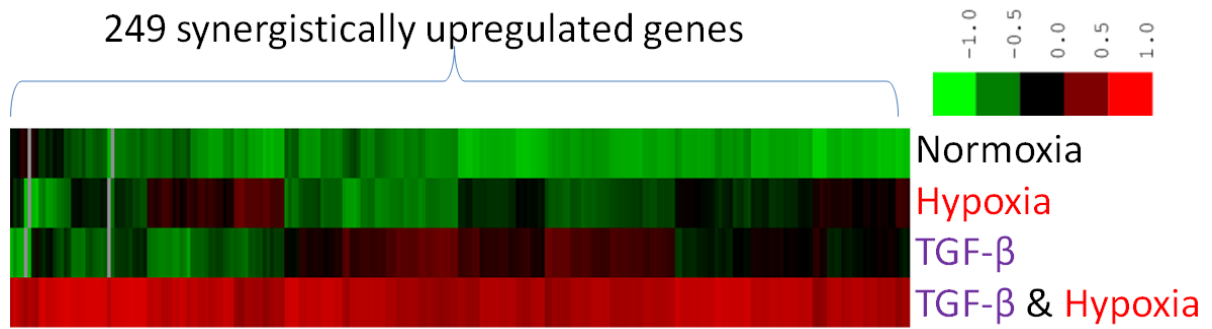
(図 10) HIF-1 α と SMAD3 の共局在と転写制御の概念図

低酸素刺激と TGF- β が、それぞれ HIF-1 α と SMAD3 を誘導し、これらが転写因子のレベルで協調的に転写を制御すると推測した。

4.4 低酸素と TGF- β による遺伝子発現の変化の網羅的解析

前項で、尿細管上皮細胞において HIF-1 α と SMAD3 が転写因子レベルで共局在している可能性が示唆された。それらの共局在が遺伝子発現の変化に影響を与えるのであれば、それぞれの転写因子を誘導する因子である低酸素、TGF- β で細胞を同時に刺激した場合、遺伝子発現に何らかの特徴的な変化が現れるのではないかと予想した。

HK-2 を低酸素(±)、TGF- β (±)の 4 条件で培養し、RNA-seq で遺伝子発現を網羅的に解析した (図 11)。RNA-seq の結果から抽出した 249 個の遺伝子においては、低酸素と TGF- β で同時に刺激した場合に発現が最も高くなった。これらの遺伝子を DAVID で annotation したところ、線維化やアポトーシスなどに関連する遺伝子も含まれていた (表 4)。



(図 11) 低酸素刺激と TGF-β 刺激による HK-2 の遺伝子発現の変化

低酸素(±)、TGF-β(±)の4条件でHK-2を刺激した。249個の遺伝子は、同時刺激で発現が最も高くなった。

Term	p Value	Genes
regulation of smooth muscle cell proliferation	0.000	PDGFB, JUN, VEGFA, EDN1, ITGA2, IGFBP3, KLF4
epidermis development	0.000	LAMB3, EVPL, CST6, COL7A1, TRPV1, AHNAK2, LAMC2, SFN, COL1A1, SOX9, KLF4
regulation of cell proliferation	0.001	PDGFB, IL8, E2F7, EDN1, ITGA2, SFN, SOX9, LIF, WARS, DHRS2, CDKN1A, IL20RB, JUN, KIFAP3, VEGFA, SERPINE1, RTKN2, IGFBP3, KLF4, KCTD11, FABP6
regulation of apoptosis	0.005	IER3, CEBPG, BIRC7, ASNS, NR3C1, SFN, SOX9, NLRP1, AMIGO2, DHRS2, CDKN1A, DUSP1, BBC3, JUN, VEGFA, TNFAIP8, ABL1, IGFBP3, ANGPTL4
regulation of chemotaxis	0.005	IL8, PDGFB, VEGFA, ITGA2
response to oxygen levels	0.006	CDKN1A, PDGFB, PLOD2, VEGFA, EDN1, ITGA2, ANGPTL4
regulation of locomotion	0.007	IL8, PDGFB, CLIC4, VEGFA, EDN1, RRAS, ITGA2, IGFBP3

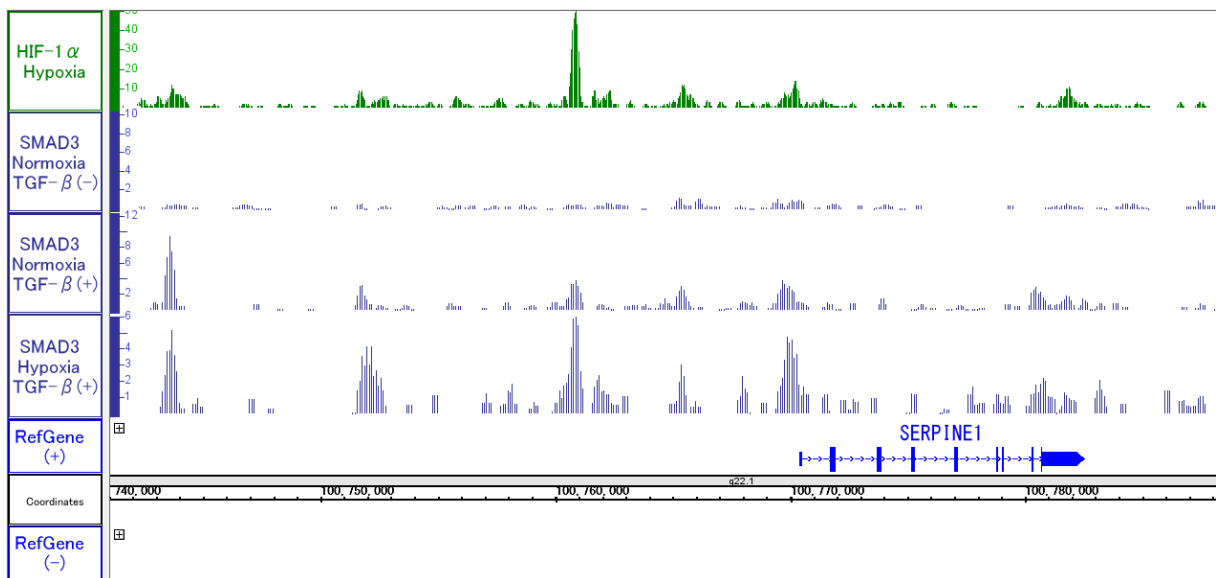
(表 4) 低酸素と TGF- β の同時刺激で発現が最も高くなった遺伝子 249 個の Gene

annotation

DAVID を用いて annotation を行った。Term には、腎障害と関係する apoptosis などが含まれていた。

4.5 HIF-1 α と SMAD3 の結合部位の網羅的解析

図 11 のように低酸素と TGF- β の同時刺激によって複数の遺伝の発現を相加的に上昇することが確認された。次に、SMAD3 と HIF-1 α がゲノムワイドで共局在しているとの仮説が正しいか確認するため、各刺激下で SMAD3 の ChIP-seq を行った (図 12)。刺激なしに比べ、TGF- β の刺激で SMAD3 の結合部位が増加したのは当然だが、TGF- β と同時に低酸素刺激を加えることで、SMAD3 の結合部位の数が約 4 倍とさらに増加した (表 5)。刺激なし、TGF- β 刺激後、TGF- β & 低酸素刺激の 3 条件で、ゲノムワイドに HIF-1 α と SMAD3 の結合部位を比較すると (図 13)、低酸素によって HIF-1 α の近傍に存在する SMAD3 が明らかに増加していた。



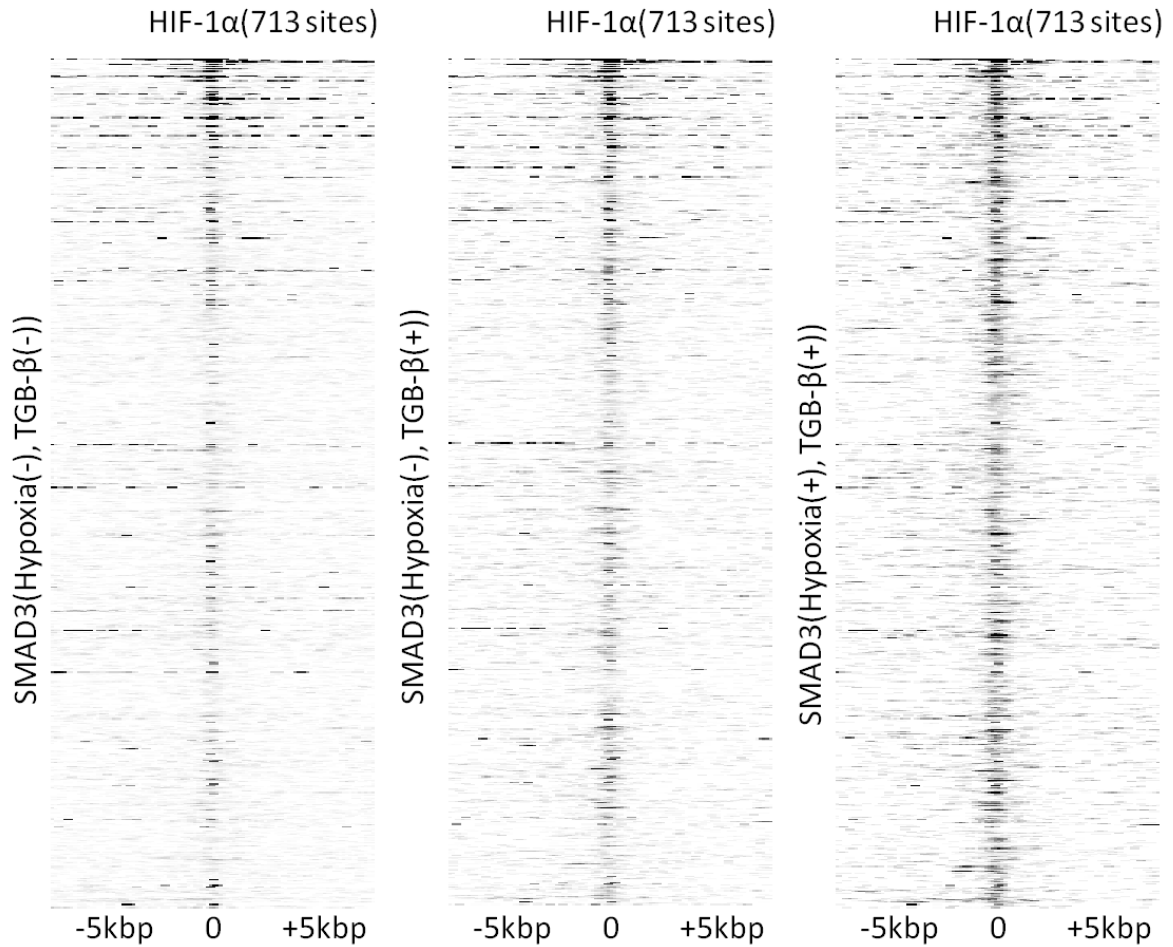
(図 12) 低酸素刺激、TGF- β 刺激による SMAD3 の binding の変化

刺激なし、TGF- β 刺激、TGF- β & 低酸素刺激の 3 条件で SMAD3 の ChIP-seq を行った。HIF-1 α と SMAD3 に共通する結合部位があり、その一部は低酸素刺激によって SMAD3 の結合が亢進した。

	number of binding sites
Normoxia, TGF- β (-)	464
Normoxia, TGF- β (+)	5159
Hypoxia, TGF- β (+)	21710

(表 5) SMAD3 の結合部位の数

(図 12) の SMAD3 の結合部位の数を、MACS p 値 $<10^{-5}$ かつ fold-enrichment 30 以上の条件で抽出した。低酸素刺激で SMAD3 の結合部位が増加した。



(図 13) HIF-1 α と SMAD3 の共局在

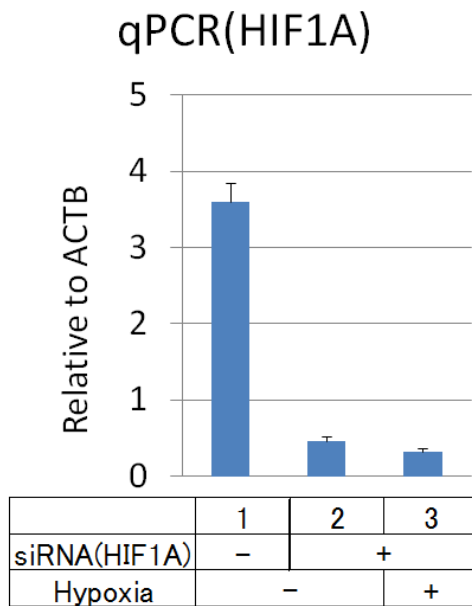
低酸素刺激後の HIF-1 α の結合部位の前後 5kbp で、SMAD3 の結合部位の分布を ChIP-seq Enrichment Site Map で表わした。各図で真ん中の縦のラインが HIF-1 α の結合部位であり、横が-5kbp から 5kbp までの 10kbp の範囲を表わしている。HIF-1 α の結合部位は、低酸素刺激 24 時間、TGF- β 刺激なしの条件である。

4.6 HIF-1 α と SMAD3 の結合部位の定量的解析

4.5 にて、低酸素によってゲノム全体における SMAD3 の結合部位が増加することが確認された。この結果から、低酸素によって SMAD3 の結合が促進すると考えられる。ゲノム全体ではなく、ゲノム上の個々の部位について、低酸素が SMAD3 の結合に与える影響を ChIP-qPCR を用いて定量的に解析した。

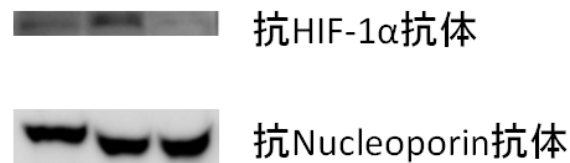
まず HK-2 に siRNA (control もしくは *HIF1A*) を行う準備として、siRNA で本当に *HIF1A* の mRNA と蛋白質がノックダウンされるか、qPCR とウエスタンブロッティング (WB) で確認した (図 14)。siRNA で *HIF1A* の発現が約 15%程度に減少していること、WB でも HIF-1 α の発現が減少していることが確認された。

A



B

ウエスタンブロッティング



	1	2	3
Hypoxia	-	+	
siRNA(HIF1A)	-	+	

(図 14) siRNA による *HIF1A* のノックダウン

A. *HIF1A* の qPCR

ACTB に対する *HIF1A* の発現量を表した。

B. HIF-1 α のウエスタンブロッティング

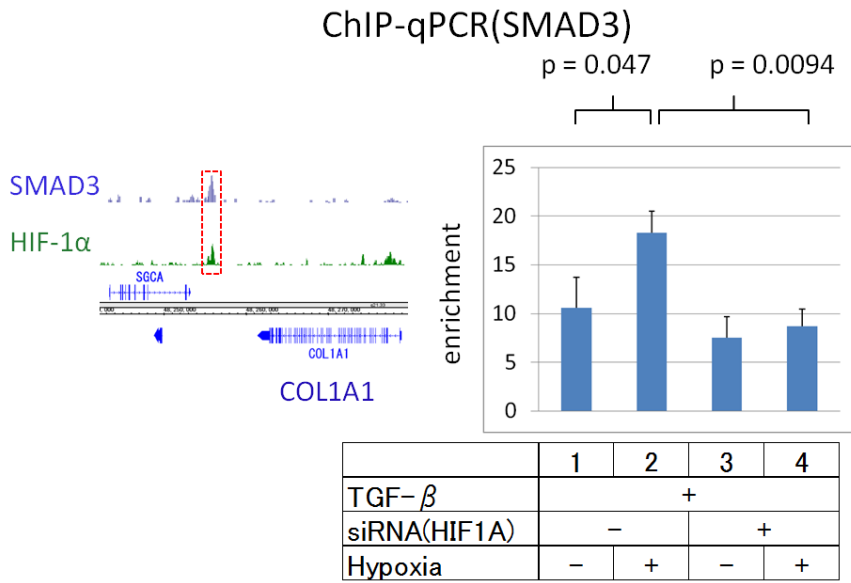
抗 HIF-1 α 抗体でウエスタンブロッティングを行った。サンプル量が一定であることを示すため、Nucleoporin を測定した。

SMAD3 の結合が TGF- β 刺激で増加することは良く知られている。TGF- β 刺激に低酸素刺激を加えた場合、SMAD3 の結合がどのように変化するか、そして HIF-1 α はどのような影響を与えているか調べるため、siRNA (*HIF1A*) の有無、低酸素の有無の 4 条件で、SMAD3 の ChIP-qPCR を行った。qPCR を行うゲノム上の部位としては、線維化に関係する遺伝子である SERPINE1、COL1A1、IGFBP3 の近傍を選んだ。また、これら 3 遺伝子の発現は、(図 11) で示したように TGF- β と低酸素で刺激した場合、発現が相加的に上昇した。

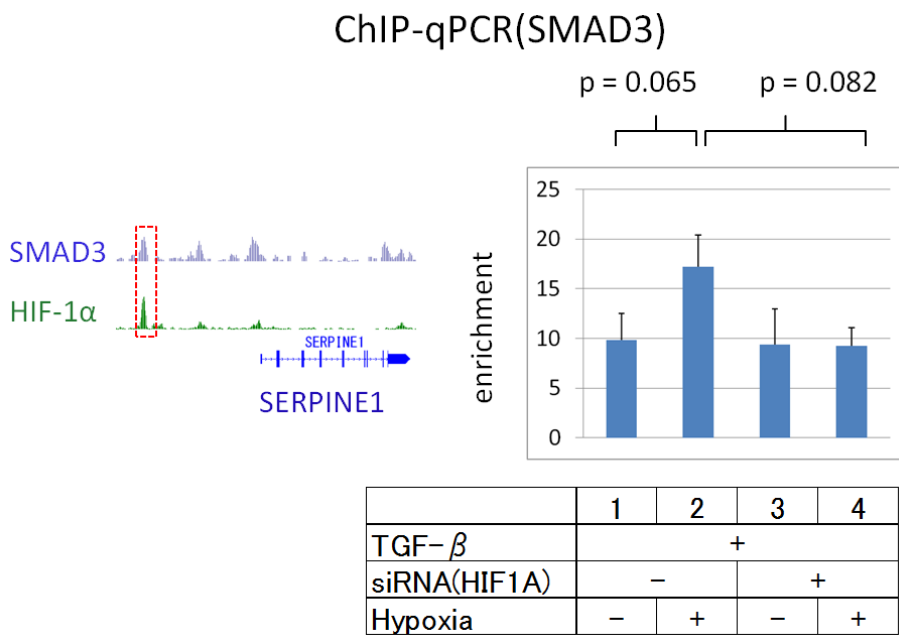
まずは HK-2 を継代し、翌日に siRNA (control もしくは *HIF1A*) を行い、翌日に TGF- β を含む培地で交換した。次に、siRNA (control)、siRNA (*HIF1A*) それぞれを 2 グループに分け、半数を通常酸素に、残りを低酸素において、4 つの条件を設定した。24 時間後にサンプルを回収して、SMAD3 の ChIP を行った (図 15)。この実験は 3 回繰り返した。

siRNA (control) においては、低酸素刺激を加えることで、SMAD3 の結合が増加した。しかし siRNA (*HIF1A*) においては、低酸素を加えても SMAD3 の結合は増加しなかった。

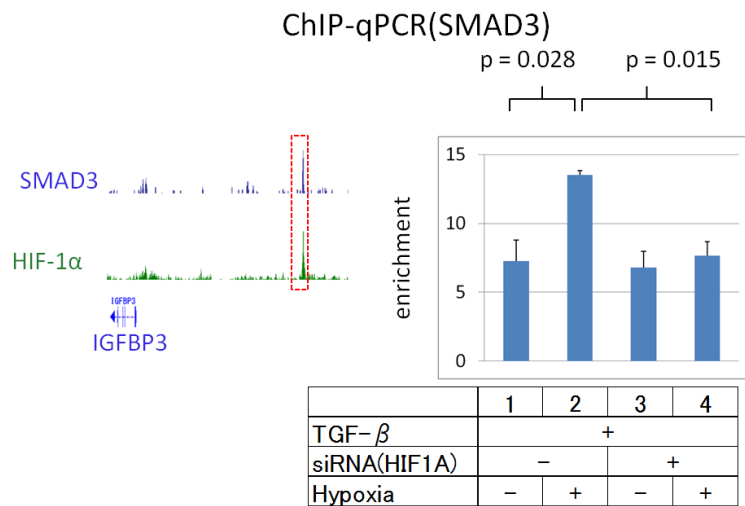
A. COL1A1 近傍の SMAD3 の ChIP-qPCR



B. SERPINE1 近傍の SMAD3 の ChIP-qPCR



C. IGFBP3 近傍の SMAD3 の ChIP-qPCR



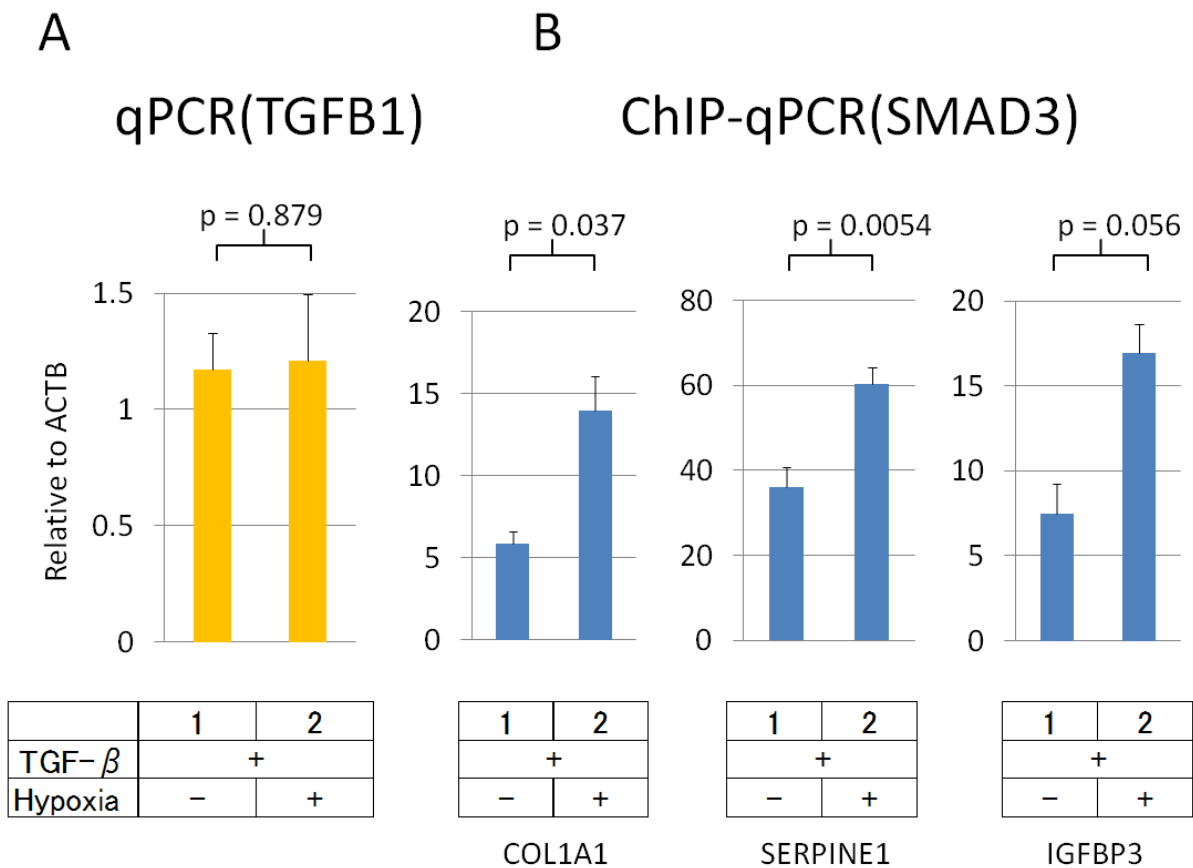
(図 15) 低酸素、TGF- β 、siRNA が SMAD3 の結合に与える影響

siRNA (control と HIF1A)、低酸素 (±)、TGF- β (+) の 4 条件で、HK-2 の SMAD3 の ChIP-qPCR を行った。

4.7 低酸素が TGF- β の発現に与える影響

HIF-1 α によって、転写因子レベルで SMAD3 の結合が促進されるとの仮説を立てた。しかし、低酸素によって *TGFBI* の発現が増加する場合があります、低酸素によって誘導された細胞由来の TGF- β が SMAD3 の結合を誘導したに過ぎないと考えることも可能である。この機序の影響を除外しても、HIF-1- α が SMAD3 の結合を促進すると証明するため、以下の実験を行った。

低酸素刺激後 4 時間では *TGFBI* の発現は増加しないが (図 16A)、この時点で SMAD3 の結合は増加していた (図 16B)。複数の遺伝子近傍で、SMAD3 の結合の増加が確認された。



(図 16) 低酸素と TGF β 刺激 4 時間後の TGFB1 の発現と SMAD3 の ChIP-qPCR

A. TGF- β 刺激のみを 4 時間加えた場合と、TGF- β 刺激&低酸素刺激を 4 時間を加えた場合の、TGFB1 の発現の比較

TGFB1 の発現量は、ACTB で補正した

B. TGF- β 刺激のみを 4 時間加えた場合と、TGF- β 刺激&低酸素刺激を 4 時間を加えた場合の、SMAD3 の ChIP-qPCR の濃縮の比較

COL1A1、SERPINE1、IGFBP3 近傍の結合部位は、図 14 と同じ

第5章 考察

5.1 低酸素刺激による遺伝子発現の変化の網羅的解析

様々な外部からの刺激に対する細胞の反応は、細胞の種類ごとに異なる[20]。腎臓の尿細管上皮細胞の低酸素に対する反応を調べるため、HK-2細胞を用いて実験を行った。HK-2細胞は正常なヒト腎臓尿細管上皮細胞由来の細胞株で[12]、腎臓尿細管上皮細胞のモデルとして頻用されている。HK-2と比較するため、ヒト腎臓尿細管上皮細胞とは異なる細胞として、ヒト臍帯静脈内皮細胞のHUVECを選び、実験に利用した。

まずは遺伝子全体の変化をみるため、各時間の発現量を0時間の発現量で割った値を求めて、クラスタリングした(図3,4)。遺伝子の発現量の変化については次項(5.2)で詳細を確認することとして、全体を概観して以下①、②の特徴が認められた。

①多くの遺伝子で、発現量の変化は一方向性であった。つまり増加する遺伝子は増加する方向に、減少する遺伝子は減少する方向に変化するものが多く、増減するような遺伝子はごく少数であった。HK-2を低酸素に置き、遺伝子発現の変化をDNA microarrayで確認した研究があり[21]、測定時間が0時間、8時間、16時間、36時間と本研究とは一部異なっているが、同様の傾向が認められた。本研究ではRNA-seqを用いたが、上記のDNA microarrayによる報告と明らかな矛盾はなく、RNA-seqとDNA microarrayの結果に一定の再現性があることの傍証であると考えられた。

RNA-seqとDNA microarrayは、いずれもゲノムワイドにmRNAの発現量を調べるツールとして使われているが、一般にはRNA-seqのほうがゲノム上の位置の分解能が

高くノイズも少ないと言われている[22]。ただし、RNA-seq と DNA microarray を比較したところ、DNA microarray でしか発現の変化を検出できなかった遺伝子が 14% あったとの報告や[23]、in vivo のサンプルによる様々な条件下の比較では遺伝子の発現量が少ない場合は RNA-seq のほうが発現変化の検出に優れていたとの報告があり[24]、いずれかが勝っていると一概には言えない。

②HK-2 では発現が増加する遺伝子よりも減少する遺伝子が多かったが、HUVEC では増加する遺伝子と減少する遺伝子がほぼ同数であった。このように細胞ごとに遺伝子発現の変化に差があった。なお、先ほどの報告では、0 時間と 8 時間を比べると増加する遺伝子が 125 個、減少する遺伝子が 103 個であったが[21]、本研究では増加する遺伝子が 167 個、減少する遺伝子が 247 個であった。この差は、RNA-seq と DNA microarray で RPKM と信号強度が必ずしも比例していないこと、本研究では 11434 個の遺伝子を解析したが、先行研究では旧製品の DNA microarray を利用したため 1571 個の遺伝子しか解析できなかったことなどが影響したと考えられる。

5.2 低酸素刺激後、各時間に増加した遺伝子の annotation

RNA-seq および DNA microarray で低酸素 0 時間から 24 時間までの遺伝子発現を網羅的に調べた。速やかに上昇する遺伝子もあれば、上昇に時間がかかる遺伝子もあった。一般に、刺激による遺伝子発現の変化には細胞特異性があるので、本実験でも各時間に上昇する遺伝子が細胞ごとに異なると予想された。

低酸素刺激 2 時間、4 時間、8 時間、12 時間、24 時間のそれぞれの時間で発現量 (HK-2 では RPKM、HUVEC ではプローブの信号強度) が 0 時間に比べて初めて 2 倍を越えた遺伝子の個数は、それぞれ HK-2 で 19 個、53 個、131 個、242 個、431 個、HUVEC で 39 個、144 個、330 個、200 個、760 個であり、これら遺伝子の集合 10 組について gene annotation を行ったところ (表 1、2) の結果が出た。

細胞ごとに反応が異なる遺伝子もあれば、同じように反応する遺伝子もあり、低酸素で上昇することが良く知られている遺伝子の ADM[25]、DDIT4[26]は、いずれの細胞でも 2 時間までに発現が 2 倍を越えており、2 時間の Term として「response to hypoxia」が細胞間で共通していた。

HUVEC では血管内皮細胞由来であることと関連がありそうな Term もあり、「blood vessel development」が出現していた。このように各時間の遺伝子発現の変化から単純な計算で選択した遺伝子の集合にも、細胞固有の性質との関連が示唆された。

また解糖系に関する Term は、いずれの細胞でも出現したが、その時間は異なっていた。解糖系の亢進は、低酸素によって誘導される代表的な細胞の反応の一つであり [27]、酸素消費を抑制することで細胞を保護すると考えられている。HUVEC では 24 時間の時点でも ALDOA、GPI[28]など解糖系を促進する遺伝子が上昇しており、この点でも低酸素に対する反応が細胞ごとに異なっていた。低酸素への順応は細胞ごとに異なっており、解糖系亢進の時間差も影響をしている可能性があると考えられた。

5.3 ChIP-seq による HIF-1 α の細胞特異的な転写制御の網羅的解析

細胞が低酸素で生存するために、様々な仕組みを備えているが、その中でも中心的な働きをする蛋白質として HIF (hypoxia-inducible factor) [6]が知られている。HIF は低酸素で活性化する代表的な転写因子である。HIF は、 α サブユニットと β サブユニットが2量体を形成することで転写因子として働く。 α サブユニットはHIF-1 α 、HIF-2 α 、HIF-3 α の3つの isoform があり、 β サブユニットは1種類のみである。 β サブユニットは安定して存在しており、 α サブユニットの量で HIF の転写活性が規定されている[7]。通常酸素では α サブユニットが PHD によって残基が水酸化され[7]、これが VHL に認識されることでユビキチン化され、速やかに分解される。一方、低酸素であればこの反応が進まないため、 α サブユニットが蓄積し、 β サブユニットと2量体を形成する。

α サブユニットの isoform のうち、HIF-1 α はほぼ全身の細胞に発現しているが、HIF-2 α は内皮細胞など限られた細胞にしか発現していない。HIF-3 α は、他のサブユニットに比べ知見が少ないが、転写活性化領域を欠いており、一般には転写抑制因子であると考えられている[29]。腎臓尿細管上皮細胞において、蛋白レベルで発現している α サブユニットは HIF-1 α のみであり、HIF-2 α は発現していないと報告されている。以上から低酸素刺激による HK-2 特異的な遺伝子発現の上昇は、HIF-1 α の影響をより受けていると予想した。HIF-1 α が HK-2 と HUVEC の遺伝子発現に与える影響を調べるため、低酸素と通常酸素で ChIP-seq を行った (図 5)。ChIP-seq は、以前より存在する ChIP 法に、次世代シーケンサーを組み合わせた解析方法であり、ChIP-chip など旧来の方法に比べ分解能はより高い[30]。

HK-2 と HUVEC に共通する HIF-1 α の結合部位がある一方で、HK-2 のみ、HUVEC のみの結合部位もあり、低酸素における細胞特異的な転写制御との関連が考えられた。結合部位と遺伝子の関係を確認するため、個々の結合部位と近傍遺伝子の転写開始点 (transcription start sites、TSS) の距離を調べた (図 6)。HK-2 と HUVEC を比べると、HK-2 の結合部位は、より TSS 近傍に集中していた。TSS からの距離を考えると、HIF-1 α は、HK-2 においてはプロモーター領域に、HUVEC においてはエンハンサー領域に結合する傾向があると言える。一般に転写因子とエンハンサーの結合は細胞特異的であり[31]、その理由は一概には説明できないが、HUVEC においては共局在する転写因子が HK-2 と異なっていることも影響していると考えられる (図 8D)。ただし、プロモーターとエンハンサーの区別は、TSS との距離だけから判断できるものではないため、より精密な解析にはヒストン修飾などのエピジェネティックなデータも加味する必要がある[32]。

細胞特異的な HIF-1 α の結合の分布は、通常酸素、低酸素ともに認められており、HIF-1 α の結合部位は、塩基配列、酸素濃度以外にも、細胞固有の因子によって規定されていると考えられる。実際、HIF の認識する塩基配列である HRE はゲノム上に 100 万か所以上存在しているが、HIF が結合する場所は 0.1%にも満たないことが報告されている[33]。細胞特異的なクロマチン構造、つまりはエピジェネティックな因子も影響していると考えられ、実際に DNase I 高感受性の部位は、そうでない部位に比べ HIF-1 α が 19 倍結合しやすいと報告されている[33]。ただし、DNase I 高感受性の

HREに限っても、実際に HIF-1 α が結合するのは 1.1%に過ぎず、その他の因子として共局在する転写因子やヒストン修飾因子の影響も考えられる。

HIF-1 α の結合が、実際、遺伝子発現に影響を与えているか確認するため、TSS から 500bp 以内に HIF-1 α の結合がある遺伝子とない遺伝子で、遺伝子発現の変化を比べた (図 9)。中央値で見ても HIF-1 α の結合がある遺伝子は発現が増加しており、逆に、そうでない遺伝子は中央値が減少していた。

転写因子は、しばしば補助因子とともにゲノムに結合して、転写を制御する。実際、HIF-1 α が p300 や CBP を誘導することによって[34]、ヒストン H3K27 のアセチル化を促進し[35]、転写を活性化させる。また補助因子でなく、転写因子が別の転写因子と結合し、転写活性をより活性化することも知られており[36]、転写因子の共局在はしばしば細胞特異的である。HK-2 においても HIF-1 α が別の転写因子と結合し、協調的に転写を制御していると予想した。HIF-1 α の結合部位は、MACS<10-30 を閾値にすると HK-2 で 713 か所、HUVEC で 442 か所であり、うち 181 か所は共通していた (図 8)。HK-2 特異的な HIF-1 α の結合部位 532 か所に共局在する転写因子を探索するため Motif analysis を行い、DME で複数の配列が抽出された (図 8)。そのうちの 1 つが、SMAD3 の認識配列と E-value で 1.9×10^{-9} と良く一致していた。

別の方法として、TRAP を用いて HK-2 特異的な領域、HUVEC 特異的な領域、共通する領域 (図 8A) のそれぞれで Motif 解析を行ったところ、HK-2 特異的な領域で HIF-1 α の結合部位に SMAD3 の認識配列が最も集積していた (表 3)。以上の結果は、HK-2

において HIF-1 α と SMAD3 が比較的多くの場所で共局在していることを示唆するものであると考えられた。

本研究の Motif 解析で HIF-1 α との共局在が示唆された SMAD3 は、TGF- β の下流にある代表的な転写因子であり[37]、TGF- β は腎障害、その中でも特に間質線維化と関連している成長因子である[38]。例えば、TGF- β の強制発現で腎障害が進行することや[39]、SMAD3 のノックアウトで腎障害が抑制されることが報告されている[40]。低酸素刺激下では、HIF-1 α と SMAD3 が転写因子レベルで協調的に働き、腎障害を促進している可能性があるかと推察し、次項以降の検証と続けた。

5.4 低酸素と TGF- β による遺伝子発現の変化の網羅的解析

前項にて HIF-1 α と SMAD3 が転写因子のレベル協調的に働き転写を制御しているとの仮説を立てた。その仮説が正しいか調べるため、HIF-1 α を誘導する刺激として低酸素を、SMAD3 を誘導する刺激として TGF- β を用いて、HK-2 の遺伝子発現にどのような影響を与えるか確認した。低酸素の有無、TGF- β の有無で4つの条件を設定し、刺激から24時間後にサンプルを回収して RNA-seq を行った (図 11)。249 個の遺伝子は、4条件の中で低酸素と TGF- β で同時に刺激した場合に発現が最も高くなった。これらの遺伝子については、低酸素刺激と TGF- β が相乗的もしくは相加的に発現を上昇させたと考えられた。ただし、その発現の上昇が HIF-1 α と SMAD3 を介したものであると、この結果だけでは断定できないので、次項 (5.5) でさらに検討した。

これら 249 個の遺伝子にどのような特徴があるのか調べるため、DAVID を用いて annotation を行った (表 4)。Term には腎障害と関連している用語も認められた。たとえば apoptosis は、腎障害における尿細管壊死の原因の一つとなる現象であり、低酸素が尿細管上皮細胞の壊死を誘発することが報告されている[41]。腎障害と密接に関わる現象の原因となる遺伝子が、低酸素と TGF- β の同時刺激で相加的に発現が上昇することは、低酸素と TGF- β が腎障害を相加的に増悪させることを示唆していると考えられた。低酸素と TGF- β の刺激下における、HIF-1 α と SMAD3 の挙動について、次項で検討した。

5.5 HIF-1 α と SMAD3 の結合部位の網羅的解析

低酸素刺激と TGF- β 刺激が SMAD3 の結合に与える影響を調べるため、SMAD3 の ChIP-seq を行った (図 12)。TGF- β 刺激で SMAD3 の結合部位が増加するのは当然として (表 5)、TGF- β と低酸素で同時に刺激することで SMAD3 の結合部位の数が約 4 倍とさらに増えた。つまり低酸素刺激によって SMAD3 の結合が促進したと考えられた。肝細胞や尿細管上皮細胞で、低酸素が SMAD3 の結合を促進するとの報告はあるが[42][43]、これらの報告は、個々の部位について SMAD3 の結合を調べたものであり、ゲノム全体については解析されていなかった。本研究で、低酸素が SMAD3 の結合をゲノム全体においても増加させることが確認された。

低酸素によって増加する蛋白質は HIF-1 α も含め複数あり、また低酸素は細胞の代謝など蛋白質以外の細胞内環境にも影響を与える。よって、低酸素で SMAD3 の結合

が増加することは確認されたが、その作用が HIF-1 α を介した作用であるとのデータだけで断言することはできない。(5.3)において、HIF-1 α の Motif analysis から HIF-1 α と SMAD3 の結合部位が近接していると推測した。その推測が正しいか確認するため、HIF-1 α の ChIP-seq と SMAD3 の ChIP-seq を行い、HIF-1 α と SMAD3 の結合部位を比較した。Enrichment Site Map で示したように (図 13)、SMAD3 の結合部位は HIF-1 α の結合部位と無関係に増加しているのではなく、HIF-1 α の結合部位もしくは近傍で特に増加していることが確認された。

SMAD3 の結合はそれ以外の強力な転写因子によって制御される場合があり、例えば ES 細胞では OCT4 の近傍に、また筋細胞では MYOD の近傍に結合すると報告されている[44]。HIF-1 α がこのような強力な転写因子であると証明はされていないが、低酸素刺激を加えた HK-2 細胞では、SMAD3 の結合が HIF-1 α の影響を強く受けていることを示唆する結果であると考えられた。

5.6 HIF-1 α と SMAD3 の結合部位の定量的解析

前項 5-5 では、ゲノム全体における HIF-1 α と SMAD3 の結合部位を比較した。本項では、個々の転写因子結合部位について低酸素や HIF-1 α が SMAD3 の結合に与える影響を定量的に検討する。

siRNA で *HIF1A* が確実にノックダウンされたことを qPCR とウエスタンブロッティングで確認した (図 14)。既知のことであるが[7]、低酸素によって HIF-1 α の蛋白質の発現が増加することも確認できた (図 14A)。

COL1A1、SERPINE1、IFGBP3 は組織の線維化に関係することが報告されている遺伝子であり[45][46][47]、本研究でも低酸素刺激と TGF- β 刺激で発現が相加的に増加することが確認されている(図 11)。また ChIP-seq でも遺伝子近傍の同一部位に HIF-1 α と SMAD3 が結合しており、発現がこれらの部位の影響を受けていると予想された(図 15)。これら 3 つの部位について SMAD3 の ChIP-qPCR を行ったところ、通常酸素に比べて低酸素で、SMAD3 の結合が有意に増加していた。しかし *HIF1A* をノックダウンすると、この効果は消失してしまった。これは、*HIF1A* が SMAD3 の結合を促進することを支持する結果である。この結果だけでは HIF-1 α の下流に存在する別の遺伝子が SMAD3 の結合を促進させたとも考えることも可能である。しかし、(図 13) で示したように、SMAD3 と HIF-1 α が標的遺伝子近傍の同部位に結合していることも併せて考えると、HIF-1 α がその結合部位において作用し、SMAD3 の結合を促進した可能性が高い。

(図 15) で示したように、低酸素においては *HIF1A* のノックダウンによって SMAD3 の結合が有意に減少した。しかし、通常酸素においては *HIF1A* をノックダウンしても、SMAD3 の結合に著変はなかった。HIF-1 α は低酸素において蓄積する蛋白質であり、通常酸素においては皆無ではないが微量であることを考えると、通常酸素で *HIF1A* のノックダウンが SMAD3 の結合に明らかな影響を与えなかったことは矛盾ない。

本研究では HIF-1 α が SMAD3 の結合を促進すると主張しているが、一方で、TGF- β 、SMAD3 の系が mTORC1 を介して HIF-1 α の蛋白質発現を上昇させるとの報告がある[48]。ただし、mTORC1 による HIF-1 α の発現上昇は通常酸素におけるものであ

り、低酸素では mTORC1 を阻害しても HIF-1 α の発現に明らかな変化がないこと、また実験対象がメサンギウム細胞であることを考えると、本研究の結果と矛盾するものではない。もっとも、未検証ではあるが、本研究の条件下で SMAD3 が何からの機序で HIF-1 α の発現、結合に影響を与えている可能性は否定できない。

5.7 低酸素が TGF- β の発現に与える影響

本研究では、低酸素が HIF-1 α を介し転写因子のレベルで SMAD3 の結合を促進すると主張しているが、反論も考えられる。SMAD3 の上流にある TGF- β は、ほとんどすべての細胞で発現しており[49]、HK-2 でも発現している。低酸素が TGF- β を誘導する場合があります、低酸素による SMAD3 の結合促進は、HIF-1 α を介したのではなく、HK-2 由来の TGF- β を介したものである可能性が考えられる。HK-2 で *TGFBI* の発現を確認したところ、低酸素刺激を 24 時間加えると *TGFBI* の発現が増加することがあった。一方で、12 時間以内の刺激であれば、*TGFBI* の発現に大きな変化はなかった。*TGFBI* の発現と、低酸素による SMAD3 の結合の増加が関係していないことを示すため、刺激を 4 時間にして、*TGFBI* の発現と SMAD3 の結合を確認した (図 16)。低酸素の有無で *TGFBI* の発現はほとんど変化していなかったが (図 16A)、SMAD3 の結合は低酸素によって増加していた (図 16B)。この結果から、*TGFBI* の発現が増加しなくても、低酸素による SMAD3 の結合増加が起こると確認された。

第6章 結語

本研究では、尿細管上皮細胞を用いて低酸素における細胞特異的な転写制御機構を解析した。

低酸素による遺伝発現の変化に細胞特異性があることを RNA-seq で確認し、その細胞特異性の一部は、ゲノム上における HIF-1 α の結合と関係していることを ChIP-seq で示した。

HK-2 における HIF-1 α の結合部位を Motif 解析し、HIF-1 α と SMAD3 が共局在していると仮説を立て、腎障害の重要な因子である低酸素と TGF- β が転写因子のレベルで協調的に働いていると予想した。

まずは RNA-seq を行い、アポトーシスに関係する遺伝子などが、低酸素と TGF- β で相加的に上昇することを確認した。次に、HIF-1 α と SMAD3 の結合部位を調べるため、SMAD3 の ChIP-seq、ChIP-qPCR を行い、HIF-1 α と SMAD3 がゲノムワイドに共局在していること、低酸素が HIF-1 α を介して SMAD3 の結合を促進していることを定量的に示した。

以上の結果から、尿細管上皮細胞において、腎障害の原因となる低酸素と TGF- β が転写因子のレベルで協調的に転写を制御していることが示され、腎障害の複雑な機序の一端を明らかにすることができた。

本研究の結果から、HIF-1 α は SMAD3 との関係においては、腎障害を増悪させる方向に働くと予想される。しかし、臨床上の意義については未解明な部分が多く、さらなる知見の蓄積が求められる。

第7章 引用文献

1. 日本腎臓学会, CKD 診療ガイド 2012, 5, 2012
2. Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM, Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol* 241(1):F85-93 1981.
3. Ong AC, Fine LG. Loss of glomerular function and tubulointerstitial fibrosis: cause or effect? *Kidney Int* 45(2):345-51 1994.
4. Fine LG, Orphanides C, Norman JT. Progressive renal disease: the chronic hypoxia hypothesis. *Kidney Int Suppl* 65:S74-8 1998.
5. Rosenberger C, Rosen S, Heyman SN. Renal parenchymal oxygenation and hypoxia adaptation in acute kidney injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33(10):980-8 2006.
6. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 36(1):1-12 2004.
7. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(14):7987-92 1998.
8. López-Hernández FJ, López-Novoa JM. Role of TGF- β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell Tissue Res* 347(1):141-54 2012.
9. Shankland SJ, Scholey JW, Ly H, Thai K. Expression of transforming growth factor-beta 1

during diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 46(2):430-42 1994.

10. Inazaki K, Kanamaru Y, Kojima Y, Sueyoshi N, Okumura K, Kaneko K, Yamashiro Y, Ogawa H, Nakao A. Smad3 deficiency attenuates renal fibrosis, inflammation, and apoptosis after unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 66(2):597-604 2004.

11. Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 21(11):1819-34 2010.

12. Ryan MJ, Johnson G, Kirk J, Fuerstenberg SM, Zager RA, Torok-Storb B. HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int* 45(1):48-57 1994.

13. Parkinson NJ, Maslau S, Ferneyhough B, Zhang G, Gregory L, Buck D, Ragoussis J, Ponting CP, Fischer MD. Preparation of high-quality next-generation sequencing libraries from picogram quantities of target DNA. *Genome Res* 22(1):125-33 2012.

14. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W, Liu XS. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* 9(9):R137 2008.

15. Nico JW, Helt GA, Blanchard SG Jr, Raja A, Loraine AE. The Integrated Genome Browser: free software for distribution and exploration of genome-scale datasets. *Bioinformatics* 25(20):2730-1 2009.

16. Smith AD, Sumazin P, Zhang MQ. Identifying tissue-selective transcription factor binding sites in vertebrate promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(5):1560-5 2005.

17. Matys V, Fricke E, Geffers R, Gössling E, Haubrock M, Hehl R, Hornischer K, Karas D, Kel AE, Kel-Margoulis OV, Kloos DU, Land S, Lewicki-Potapov B, Michael H, Münch R, Reuter I, Rotert S, Saxel H, Scheer M, Thiele S, Wingender E. TRANSFAC: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucleic Acids Res* 31(1):374-8 2003.
18. Mahony S, Benos PV. STAMP: a web tool for exploring DNA-binding motif similarities. *Nucleic Acids Res* 35(Web Server issue):W253-8 2007.
19. Roider HG, Kanhere A, Manke T, Vingron M. Predicting transcription factor affinities to DNA from a biophysical model. *Bioinformatics* 23(2):134-41 2007.
20. Miller-Jensen K, Janes KA, Brugge JS, Lauffenburger DA. Common effector processing mediates cell-specific responses to stimuli. *Nature* 448(7153):604-8 2007.
21. Leonard MO, Cottell DC, Godson C, Brady HR, Taylor CT. The role of HIF-1 alpha in transcriptional regulation of the proximal tubular epithelial cell response to hypoxia. *J Biol Chem* 278(41):40296-304 2003.
22. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10(1):57-63 2009.
23. Kogenaru S, Qing Y, Guo Y, Wang N. RNA-seq and microarray complement each other in transcriptome profiling. *BMC Genomics* 13:629 2012.
24. Wang C, Gong B, Bushel PR, Thierry-Mieg J, Thierry-Mieg D, Xu J, Fang H, Hong H, Shen J, Su Z, Meehan J, Li X, Yang L, Li H, Łabaj PP, Kreil DP, Megherbi D, Gaj S, Caiment F, van Delft J, Kleinjans J, Scherer A, Devanarayan V, Wang J, Yang Y, Qian HR, Lancashire

- LJ, Bessarabova M, Nikolsky Y, Furlanello C, Chierici M, Albanese D, Jurman G, Riccadonna S, Filosi M, Visintainer R, Zhang KK, Li J, Hsieh JH, Svoboda DL, Fuscoe JC, Deng Y, Shi L, Paules RS, Auerbach SS, Tong W. The concordance between RNA-seq and microarray data depends on chemical treatment and transcript abundance. *Nat Biotechnol* 32(9):926-32 2014
25. Cormier-Regard S, Nguyen SV, Claycomb WC. Adrenomedullin gene expression is developmentally regulated and induced by hypoxia in rat ventricular cardiac myocytes. *J Biol Chem* 273(28):17787-92 1998.
26. Shoshani T, Faerman A, Mett I, Zelin E, Tenne T, Gorodin S, Moshel Y, Elbaz S, Budanov A, Chajut A, Kalinski H, Kamer I, Rozen A, Mor O, Keshet E, Leshkowitz D, Einat P, Skaliter R, Feinstein E. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol Cell Biol* 22(7):2283-93 2002.
27. Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* 8(9):705-13 2008.
28. Hamaguchi T, Iizuka N, Tsunedomi R, Hamamoto Y, Miyamoto T, Iida M, Tokuhisa Y, Sakamoto K, Takashima M, Tamesa T, Oka M. Glycolysis module activated by hypoxia-inducible factor 1alpha is related to the aggressive phenotype of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 33(4):725-31 2008.
29. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 versus HIF-2--is one more important than the other? *Vascul Pharmacol* 56(5-6):245-51 2012.

30. Park PJ. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat Rev Genet* 10(10):669-80 2009.
31. Heintzman ND, Hon GC, Hawkins RD, Kheradpour P, Stark A, Harp LF, Ye Z, Lee LK, Stuart RK, Ching CW, Ching KA, Antosiewicz-Bourget JE, Liu H, Zhang X, Green RD, Lobanenkov VV, Stewart R, Thomson JA, Crawford GE, Kellis M, Ren B. Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* 459(7243):108-12 2009.
32. Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching KA, Wang W, Weng Z, Green RD, Crawford GE, Ren B. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet* 39(3):311-8 2007.
33. Schödel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood* 117(23):e207-17 2011.
34. Chan HM, La Thangue NB. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci* 114(Pt 13):2363-73 2001.
35. Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. *Curr Biol* 14(14):R546-51 2004.
36. Xie D, Boyle AP, Wu L, Zhai J, Kawli T, Snyder M. Dynamic trans-acting factor colocalization in human cells. *Cell* 155(3):713-24 2013.

37. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390(6659):465-71 1997.
38. Böttinger EP, Bitzer M. TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13(10):2600-10 2002.
39. Koesters R, Kaissling B, Lehir M, Picard N, Theilig F, Gebhardt R, Glick AB, Hähnel B, Hossler H, Gröne HJ, Kriz W. Tubular overexpression of transforming growth factor-beta 1 induces autophagy and fibrosis but not mesenchymal transition of renal epithelial cells. *Am J Pathol* 177(2):632-43 2010.
40. Sato M, Muragaki Y, Saika S, Roberts AB, Ooshima A. Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest* 112(10):1486-94 2003.
41. Saikumar P, Venkatachalam MA. Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney. *Semin Nephrol* 23(6):511-21 2003.
42. Sánchez-Elsner T, Ramírez JR, Sanz-Rodríguez F, Varela E, Bernabéu C, Botella LM. A cross-talk between hypoxia and TGF-beta orchestrates erythropoietin gene regulation through SP1 and Smads. *J Mol Biol* 336(1):9-24 2004.
43. Basu RK, Hubchak S, Hayashida T, Runyan CE, Schumacker PT, Schnaper HW. Interdependence of HIF-1 α and TGF- β /Smad3 signaling in normoxic and hypoxic renal epithelial cell collagen expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 300(4):F898-905 2011.
44. Mullen AC, Orlando DA, Newman JJ, Lovén J, Kumar RM, Bilodeau S, Reddy J,

Guenther MG, DeKoter RP, Young RA. Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF- β signaling. *Cell* 147(3):565-76 2011.

45. Yokoi H, Sugawara A, Mukoyama M, Mori K, Makino H, Suganami T, Nagae T, Yahata K, Fujinaga Y, Tanaka I, Nakao K. Role of connective tissue growth factor in profibrotic action of transforming growth factor-beta: a potential target for preventing renal fibrosis. *Am J Kidney Dis* 38(4 Suppl 1):S134-8 2001.

46. Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins PJ. TGF- β signaling in tissue fibrosis: redox controls, target genes and therapeutic opportunities. *Cell Signal* 25(1):264-8 2013.

47. Johnson DW, Saunders HJ, Baxter RC, Field MJ, Pollock CA. Paracrine stimulation of human renal fibroblasts by proximal tubule cells. *Kidney Int* 54(3):747-57 1998.

48. Rozen-Zvi B, Hayashida T, Hubchak SC, Hanna C, Plataniias LC, Schnaper HW. TGF- β /Smad3 activates mammalian target of rapamycin complex-1 to promote collagen production by increasing HIF-1 α expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 305(4):F485-94 2013.

49. Thompson NL, Flanders KC, Smith JM, Ellingsworth LR, Roberts AB, Sporn MB. Expression of transforming growth factor-beta 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice. *J Cell Biol* 108(2):661-9 1989.

謝辞

本研究の指導教官である東京大学大学院医学系研究科腎臓内科学分野、南学正臣教授には、本研究の遂行にあたり、多大なるご高配とご指導、ご鞭撻を賜りました。

本研究の指導委託教官である東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分野、油谷浩幸教授には、本研究の遂行にあたり、多大なるご高配とご指導、ご鞭撻を賜りました。

本研究の遂行にあたり、東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分野、野村征太郎博士研究員に多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました。

本研究の解析にあたり、東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分野、藤田隆教研究員に多大なるご指導、ご協力を賜りました。

本研究の解析にあたり、東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分野、三村維真理特別研究員に多大なるご指導、ご協力を賜りました。

本研究の試料作製にあたり、東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分野、目黒裕子技術員、川辺さおり技術員、椎名香織技術員、藤中恭子技術員に多大な

るご協力を賜りました。

本研究全般において、東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分野、辰野健二博士研究員、山本尚吾特任研究員、関元昭博士研究員、野中綾博士研究員、岡部篤史博士研究員には、数々のご教示、ご協力を頂きました。

本研究で、ご指導、ご鞭撻、ご高配、ご協力賜りました上記の方々、および東京大学大学院医学系研究科腎臓内科分野、東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分野の皆様様に、深謝申し上げる次第です。