

論文の内容の要旨

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

末期腎不全患者は増加傾向にあり、その予備軍である慢性腎臓病の患者も 1000 万人を越えている。慢性腎臓病は、その他にも心血管障害などの原因となる健康上の重大な問題である。

腎障害の原因は数多いが、末期腎不全の病理像は良く似ており、共通する腎障害機序が想定されている。古典的には Brenner の糸球体過剰濾過説があるが、近年では尿細管・間質の低酸素が腎障害の原因かつ結果であるとする慢性低酸素仮説が注目を集めている。血管障害、糸球体障害、尿細管間質障害など様々な障害が尿細管間質に低酸素を引き起こす。低酸素で障害された尿細管間質には線維化が起こり、そのため尿細管間質の低酸素が増悪する。この悪循環によって腎障害が進行すると説明される。

低酸素における重要な転写因子として、HIF-1 α がある。HIF-1 α は通常酸素では速やかに分解されるが、低酸素では蓄積し、その下流にある遺伝子の転写を活性化し、解糖系の亢進、血管新生など数多くの反応を誘導する。HIF-1 α は障害を受けた腎の尿細管間質細胞でも陽性となり、一般には腎保護作用を持つとされる。また、腎障害と深くかかわる因子として、サイトカインの一種である TGF- β とその下流にある転写因子の SMAD3 が良く知られている。これらは腎障害の増悪因子だと考えられている。本研究では、腎臓尿細管上皮細胞における HIF-1 α と SMAD3 の関係について、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。

外部刺激に対する反応は細胞特異的であり、低酸素に関してもこれは当てはまると予想された。低酸素における遺伝子発現の変化の細胞特異性を調べるため、ヒト尿細管上皮細胞由来の HK-2 細胞とヒト臍帯静脈内皮細胞の HUVEC を用いて比較した。各細胞を低酸素に 0、2、4、8、12、24 時間において、遺伝子発現の変化を RNA-seq もしくは DNA microarray で確認した。低酸素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、ほとんどの場合、発現の変化の方向は増加か減少の一方であった。0 時間に比べ、2 時間から 24 時間の各時点で初めて発現が 2 倍を越えた遺伝子は、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。

細胞の反応の特徴をつかむために、これらの遺伝子について annotation を行った。「response to hypoxia」が2時間の時点で、いずれの細胞でも出現していた。一方、HUVEC のみに「blood vessel development」など、細胞の性質を反映した用語が出現した。また「glycolysis」など解糖系関連の用語はいずれの細胞でも出現したが、出現する時間が異なっており、細胞特異的な低酸素への抵抗性と関係していると考えられた。HK-2 には、「apoptosis」など腎障害と関連する用語もあり、低酸素と腎障害の関連が示唆された。

低酸素における遺伝子発現が細胞特異的である理由の一つとして、低酸素における中心的な転写因子である HIF-1 α が関係していると予想した。HIF-1 α は α サブユニットと β サブユニットからなる2量体の蛋白質であり、通常酸素においては α サブユニットが速やかに分解されるが、低酸素においては蓄積し、2量体を形成することで核移行し、多くの場合、転写活性化因子として働く。HIF-1 α は低酸素で細胞、臓器を保護する因子であるとの複数報告されている。

HIF-1 α による転写制御が細胞特異的であることを確認するため、HK-2 と HUVEC における HIF-1 α のゲノム上の結合部位を ChIP-seq で調べた。MACS で p 値 $< 10^{-5}$ をかつ fold-enrichment 30 以上を閾値にしたところ、HIF-1 α の結合部位の数は、HK-2 で 713 か所、HUVEC で 442 か所であった。各遺伝子の転写開始点 (transcription start sites、TSS) と HIF-1 α の結合部位の位置関係を確認したところ、HK-2 では約半数が TSS から 500bp 以内に結合していたが、HUVEC は約2割であった。つまり、HIF-1 α は HK-2 ではプロモーター領域に結合する傾向があり、HUVEC においてはエンハンサー領域に結合する傾向があることが確認された。HIF-1 α の結合部位の違いは、エピジェネティックな因子の影響を受けていると考えられるが、現在の知見では HIF-1 α の結合の細胞特異性を一部しか説明できない。

転写因子はしばしば補助因子と結合して、転写を制御している。転写因子は、補助因子以外にも、他の転写因子と結合して、転写を活性化したり、抑制したりすることがある。HK-2 において、HIF-1 α が他の転写因子と共局在して、転写制御に関わっていると仮定し、この転写因子を検索した。上記の HK-2 における HIF-1 α の結合部位 713 か所中、HK-2 特異的な 532 か所の結合部位について DME で motif 解析を行い、転写因子の認識配列によく似た配列を複数抽出した。これら認識配列の中には、HUVEC 特異的な領域から抽出できなかったものもあり、その一つが SMAD3 の認識配列であった。この結果から、HK-2 ではゲノム上の少なくとも一部では、HIF-1 α が SMAD3 と共局在している可能性が高いと考えられた。SMAD3 は TGF- β の下流にある転写因子であり、TGF- β 、SMAD3 とともに腎障害を促進することが報告されている因子である。

HK-2 の HIF-1 α 結合部位全体の配列を TRAP で motif 解析したところ、全体で見ても SMAD3 の認識配列と特異的に一致していることが確認された。これらの結果から、HK-2 ゲノム全体の複数の

箇所では HIF-1 α と SMAD3 が共局在し、転写制御にも影響を与えているとの仮説を立てた。これらの仮説を実証するため、HK-2 を用いてさらに実験を進めた。

HIF-1 α を誘導する低酸素と SMAD3 を誘導する TGF- β の両方で HK-2 を刺激した場合、いずれか片方で刺激するよりも発現が高くなる遺伝子が 249 個あった。これらの遺伝子について annotation を行ったところ、「regulation of apoptosis」など腎障害に関係する用語が含まれていた。実際に、低酸素と TGF- β は腎臓の線維化に関係している重要な因子であり、これらの刺激が腎線維化に関係する遺伝子を相加的に増加させたことは、実際の疾患でも起こりうる機序を反映していると考えられた。

次に HIF-1 α と SMAD3 が共局在しているのか、HIF-1 α のデータと比べるため SMAD3 の ChIP-seq を、刺激なし、TGF- β 刺激あり、TGF- β & 低酸素刺激ありの 3 条件で行った。閾値を MACS で p 値 $< 10^{-5}$ をかつ fold-enrichment 30 以上にしたところ、それぞれの条件で、SMAD3 の結合部位の数は 464 個、5159 個、21710 個であった。TGF- β 刺激で SMAD3 の結合部位が増加するのは当然であるが、これに低酸素刺激を加えることで SMAD3 の結合部位はさらに約 4 倍に増加した。このことから低酸素は SMAD3 の結合を促進すると考えられた。

次に、ゲノム上における HIF-1 α の結合部位と SMAD3 の結合部位がどの程度一致するのか調べるため ChIP-seq Enrichment Site Map で、HIF-1 α 結合部位の近傍における SMAD3 の結合を表示したところ、刺激なし、TGF- β 刺激あり、TGF- β & 低酸素刺激ありの順に HIF-1 α と位置する SMAD3 が増加することが確認された。HIF-1 α と SMAD3 の結合部位が一致していたことは、低酸素による SMAD3 の結合の増加が HIF-1 α を介した作用によることを示唆する結果であったと考えられた。

上記のように低酸素によって SMAD3 の結合が促進すると推察された。そこで、ゲノム全体ではなく、ゲノム上の 3 か所の部位について、低酸素と HIF-1 α 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。なお、この 3 か所は、腎臓線維化と関連する遺伝子である COL1A1、SERPINE1、IGFBP3 の近傍であり、ChIP-seq で HIF-1 α と SMAD3 の結合が確認済みである。これら 3 つの遺伝子は、低酸素と TGF- β 刺激で発現が相加的に上昇したことが RNA-seq で確認された前述の 249 遺伝子に含まれる。

TGF- β はすべてに加え、siRNA (HIF1A)、低酸素それぞれの有無で 4 条件を設定し SMAD3 の ChIP を行った。低酸素と比べ、低酸素では SMAD3 の結合が増加していた。しかし siRNA (HIF1A) を加えると、低酸素による SMAD3 結合増加の効果は消失した。

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が、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、

網羅的解析で 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を併せて考えると、HIF-1 α がその部位で働き SMAD3 の結合に影響を与えた可能性が高いと予想される。

低酸素が HIF-1 α を介して転写因子レベルで SMAD3 の結合を促進するとの仮説に対して、低酸素によって TGF β 1 の発現が増加し、それが SMAD3 の結合を促進させているだけではないかとの、反論が考えられる。この反論を否定するため、低酸素刺激と TGF- β 刺激を 4 時間行い、SMAD3 の ChIP を行った。低酸素刺激 4 時間では、TGF β 1 の発現は増加しないが、SMAD3 の結合は増加しており、TGF β 1 の発現上昇の影響はないと考えられた。

本研究では、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を示し、腎障害の複雑な機序の一端を解明することができたと考える。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作用すると予想されるが、臨床上の意義については未解明な部分が大きく、さらなる知見の蓄積が求められる。