

特集：糖尿病性腎症の成因と病態—新たな展開

HIF-1 α

牧野雄一 磯江つばさ 羽田勝計

糖尿病性腎症と転写因子

近年の代謝制御における遺伝子発現調節機構の解明は、糖尿病、脂質異常症をはじめとする代謝疾患における臓器障害の分子病態の理解にも進展をもたらしている。糖尿病性腎症における糸球体細胞外基質産生の増加とメサンギウム領域の拡大、動脈硬化性病変、尿細管基底膜の肥厚、間質の線維化などの成立に、Smad, CREB, AP-1, NF κ B, SREBP-1 などの転写因子の発現や機能の異常が関与する可能性が示されている^{1,2)}。

Hypoxia-inducible factor-1 : HIF-1

転写因子 HIF-1 は、細胞の低酸素環境への曝露により活性化され、各種解糖系酵素、糖輸送担体、ミトコンドリア

呼吸鎖複合体などの遺伝子発現の制御を介し、低酸素下の細胞代謝調節に重要な役割を果たす(図 1)。

HIF-1 はいずれも basic helix-loop-helix (bHLH)/PAS 型蛋白質ファミリーに属する 2 つのサブユニット HIF-1 α と HIF-1 β から成るヘテロ二量体である。HIF-1 β サブユニットは、bHLH/PAS 型蛋白質の共通の二量体形成パートナーとして恒常的に核内に存在して機能することから、HIF-1 の転写因子としての低酸素誘導性は HIF-1 α サブユニットが担っていると考えられている。正常酸素分圧下の細胞において、HIF-1 α 蛋白質は分子内のプロリン残基の水酸化修飾とそれに引き続くユビキチン化の後、プロテアソームにおいて速やかに分解される。低酸素下では、HIF-1 α 蛋白質の水酸化酵素の活性低下により HIF-1 α 蛋白質の分解が抑制され、HIF-1 α 蛋白質の発現量が増大、活性化されることが従来より示されてきた。

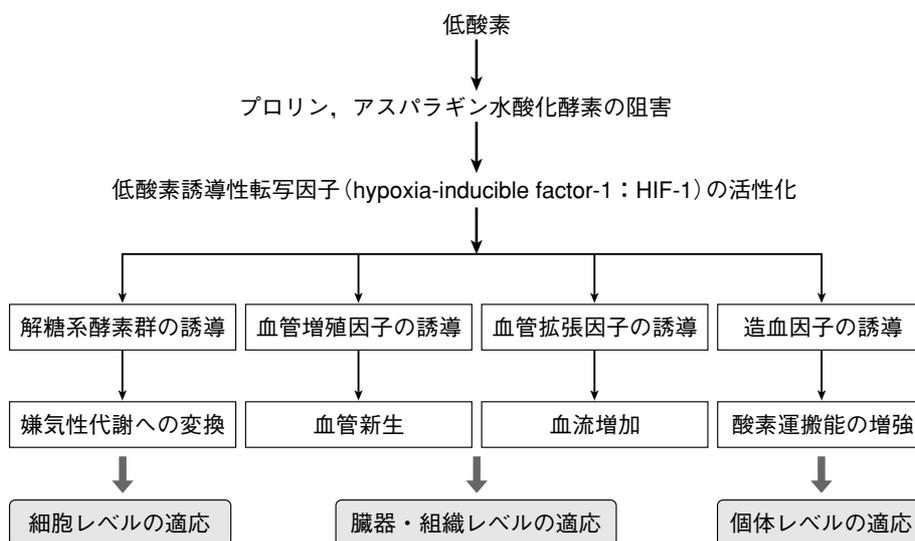


図 1 低酸素誘導性転写因子 HIF-1 と生体の低酸素適応

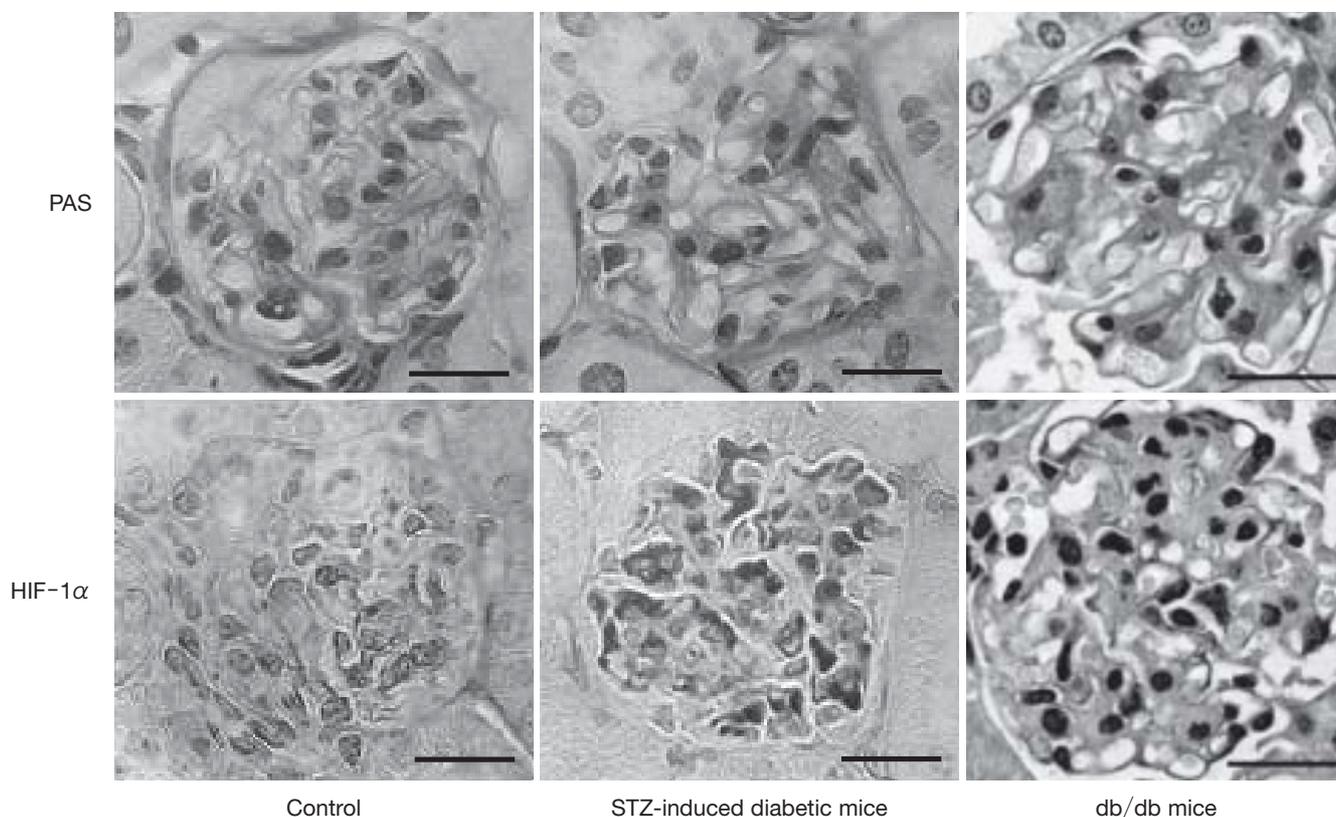


図 2 STZ 誘導糖尿病モデルマウスの腎臓糸球体における HIF-1 α 発現

一方最近、HIF-1 α が、生体内の代謝異常、炎症に始まるシグナルにより、正常酸素環境下においても活性化されることが明らかにされ、HIF-1が、低酸素環境への適応のみならず、広く細胞機能制御あるいは多くの疾患の病態の成立において重要な役割を果たすことが示されている³⁾。HIF-1 α を正常酸素分圧下に誘導する刺激のうち、TGF- β 、アンジオテンシン II、活性型 PKC などは、糖尿病性腎症をはじめとする種々の腎障害の病態に密接にかかわる。また、急性糸球体腎炎における尿細管障害、間質性腎炎、急速進行性糸球体腎炎における podocyte の機能異常などに、細胞周囲酸素分圧の低下、あるいは HIF-1 発現の異常が関連することが示されているほか、腎組織障害に伴う血管床の減少、間質の線維化などによる局所の慢性虚血/低酸素に対して HIF-1 が防御因子としての役割を担っていることが示唆されており、腎疾患における HIF-1 発現の病態生理学的意義について注目されている^{4,5)}。糖尿病性腎症においても、糖尿病モデル動物の腎糸球体での HIF-1 α の発現が確認されている⁶⁾。しかしながら、糸球体内のいかなる細胞に、いかなるメカニズムで発現が誘導されるかについては不明であった。

糖尿病性腎症における HIF-1 の役割

われわれは、ストレプトゾトシン (STZ) 誘導糖尿病モデルマウス、db/db 糖尿病モデルマウスより摘出した腎臓における HIF-1 α の発現様相を免疫組織学的に解析した⁷⁾。いずれのモデルマウスの腎糸球体においても、HIF-1 α 発現細胞が有意に増加していた (図 2)。HIF-1 α 発現細胞はほとんどが α -SMA 陽性細胞であり、その多くが核内での HIF-1 α 染色を示した。すなわち、糖尿病モデル動物の腎臓において、HIF-1 α がメサンギウム細胞に発現し遺伝子発現調節に寄与する可能性を示唆する結果である。

そこで、培養メサンギウム細胞を用いて、高濃度グルコース環境下のメサンギウム細胞における HIF-1 α の発現とその役割について解析した。100 mg/dL の正常濃度グルコース培養下のヒトメサンギウム細胞では、低酸素条件下のみ HIF-1 α の発現を認めたが、450 mg/dL の高濃度グルコース培養下のヒトメサンギウム細胞においては、正常酸素濃度条件下でも HIF-1 α 蛋白質の発現が誘導された。同条件下の HeLa 細胞および尿細管上皮細胞、あるいは高浸透圧培養下ヒトメサンギウム細胞では HIF-1 α 蛋白質の発現に変化はなかったことより、HIF-1 α 蛋白質発現の誘導

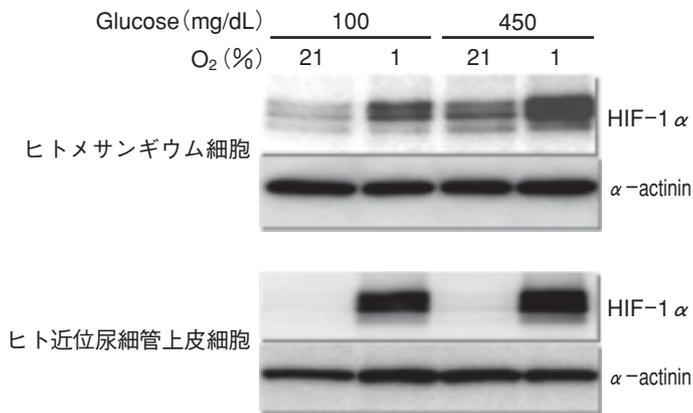


図 3 高濃度グルコースによる HIF-1 α 蛋白発現の誘導

は高濃度グルコース下のヒトメサンギウム細胞に特異的である可能性がある(図 3)。さらに、高濃度グルコースは、正常酸素分圧下で糖輸送蛋白、解糖系酵素、connective tissue growth factor (CTGF) や plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) などの遺伝子の発現を増強した(図 4a)。いずれも HIF-1 が直接に発現を制御する標的遺伝子であるが、RNA 干渉法を用いて HIF-1 α 発現を抑制した細胞においては、高濃度グルコースによるこれらの遺伝子発現誘導は認められなかった(図 4b)。すなわち、高濃度グルコースにより発現した HIF-1 が、正常酸素分圧下においても標的遺伝子発現を誘導し、メサンギウム細胞の機能障害や形質変化に寄与することが示唆される。一方、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬、TGF- β 受容体阻害薬は、いずれも高濃度グルコースによる HIF-1 α 発現に影響を与えなかったことから、高濃度グルコースはアンジオテンシン II、TGF- β を介さない独立した経路で HIF-1 α を誘導する可能性が高いと考えられる。

次に、高濃度グルコースによる HIF-1 α 発現増強のメカニズムを検討した。前述のごとく、従来、HIF-1 α 発現調節には、HIF-1 α 蛋白分解の制御が重要であることが示されている。低酸素下培養によりメサンギウム細胞において HIF-1 蛋白の発現を誘導したのち、正常濃度酸素に細胞を再曝露した際の HIF-1 α 蛋白質の消失を追跡した結果、正常濃度グルコース下、高濃度グルコース下培養で、HIF-1 α 蛋白質の分解速度に差異はなかった。一方、蛋白合成阻害剤シクロヘキシミドの存在下では、高濃度グルコースによる HIF-1 α 発現増強は速やかに打ち消された。すなわち、高濃度グルコースは HIF-1 α の蛋白質合成に至るまでの経路を制御する可能性を示唆している。さらに検討を進めた結果、高濃度グルコースは、培養メサンギウム細胞において mRNA レベルで HIF-1 α 発現を増強させていた(図 5)。

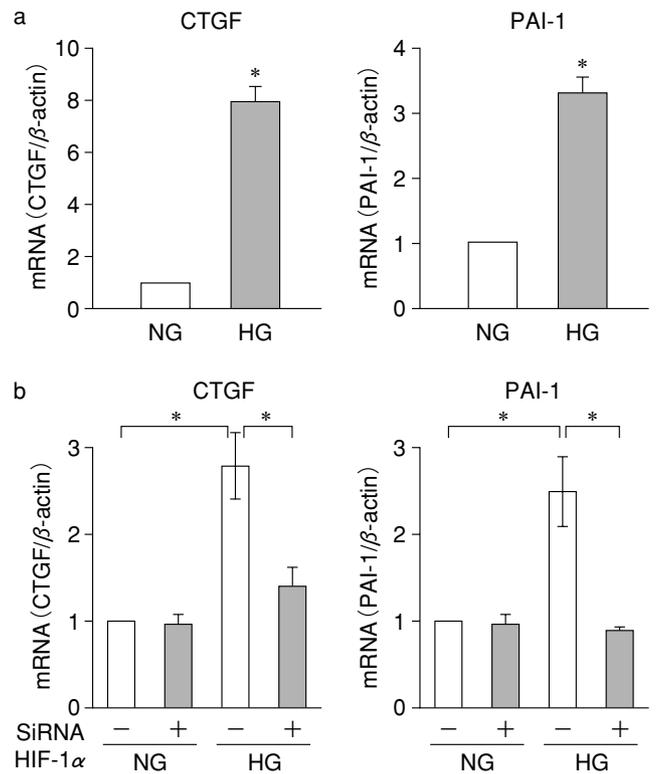


図 4

- a. 高濃度グルコースによる HIF-1 標的遺伝子発現の誘導
b. HIF-1 α 発現抑制による高濃度グルコース誘導性遺伝子発現の抑制

NG: 正常濃度グルコース, HG: 高濃度グルコース

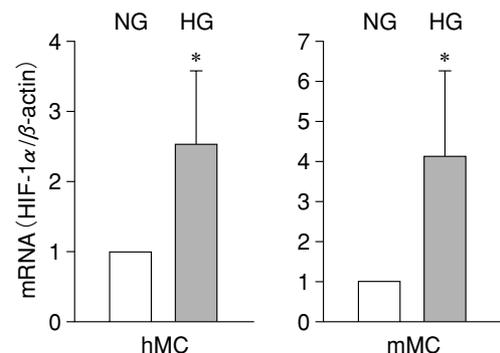


図 5 高濃度グルコースによる HIF-1 α mRNA 発現の誘導
NG: 正常濃度グルコース, HG: 高濃度グルコース
hMC: ヒトメサンギウム細胞, mMC: マウスメサンギウム細胞

糖尿病モデル動物においても、*in situ* hybridization 解析により、腎糸球体での HIF-1 α mRNA の発現亢進が確認されている。すなわち、高濃度グルコースは HIF-1 α 遺伝子の転写を活性化させ、その発現を増強させる可能性が高いと言える。実際、HIF-1 α 遺伝子プロモーターにより作動するルシフェラーゼレポーターを用いて解析した結果、高濃度グルコースが HIF-1 α 遺伝子転写開始点より約 200 bp

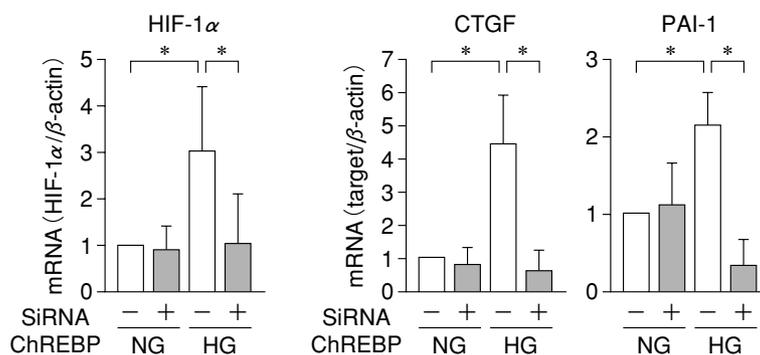


図 6 ChREBP 発現抑制による HIF-1 α および標的遺伝子発現異常の是正

上流の領域を活性化することが判明した。この領域には、グルコース応答性転写因子 (carbohydrate response element binding protein : ChREBP) の結合配列が存在する。ChREBP はグルコースや炭水化物摂取により活性化される転写因子であり、糖過剰摂取時の糖代謝、脂肪合成などエネルギー貯蔵にかかわる遺伝子群の発現を制御する。従来、ChREBP およびその標的遺伝子は肝臓に豊富に発現していることが知られていたが、腎臓における発現とその意義についてはほとんど解析されていない⁸⁾。ChREBP 結合配列に変異を導入した HIF-1 α 遺伝子プロモーターは高濃度グルコースによって活性化されず、さらに、クロマチン免疫沈降法により、高濃度グルコース下において ChREBP が HIF-1 α 遺伝子プロモーターに直接結合することが判明した。RNA 干渉法により ChREBP 発現を減少させると、高濃度グルコースによる HIF-1 α 活性化が消失し、下流の標的遺伝子発現の異常も是正された(図 6)。すなわち、高濃度グルコース下のメサンギウム細胞において、ChREBP がグルコースセンサーとして作用し、HIF-1 シグナルを作用させる可能性が高いと言える。一方、尿細管細胞での ChREBP の発現レベルは、メサンギウム細胞に比しきわめて低く、高濃度グルコースによる HIF-1 α 発現増強作用に細胞特異性を付与するメカニズムを考察するうえで興味深い。

おわりに

以上、高濃度グルコースによる ChREBP, HIF-1 α を介した遺伝子発現調節機構が糖尿病性腎症の成立ならびに進展にかかわっている可能性が示された。近年、糖尿病性腎症の治療は、厳格な血糖・血圧のコントロール、RA 系阻害薬の適切な使用を含む集約的治療により、その成績が大きく改善している。しかしながら一方で、腎症進展の阻止に至ったとは言えず、新たな治療法開発への期待は依然として大きい。細胞内外環境のグルコース濃度変化への応答

の分子機構の解明は、生活習慣病およびその合併症の治療法開発において重要な示唆をもたらすであろう。

本稿で紹介した転写因子をはじめ、糖尿病性腎症の分子病態に即した新たな標的分子の発見と、治療への応用技術開発の発展に期待する。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

- Fujimoto M, Maezawa Y, Yokote K, Joh K, Kobayashi K, Kawamura H, Nishimura M, Roberts AB, Saito Y, Mori S. Mice lacking Smad3 are protected against streptozotocin-induced diabetic glomerulopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 ; 305 : 1002-1007.
- Lu TC, Wang ZH, Feng X, Chuang PY, Fang W, Shen Y, Levy DE, Xiong H, Chen N, He JC. Knockdown of Stat3 activity *in vivo* prevents diabetic glomerulopathy. *Kidney Int* 2009 ; 76 : 63-71.
- Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)* 2009 ; 24 : 97-106.
- Haase VH. Hypoxia-inducible factors in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006 ; 291 : F271-F281.
- Nangaku M, Inagi R, Miyata T, Fujita T. Hypoxia and hypoxia-inducible factor in renal disease. *Nephron Exp Nephrol* 2008 ; 110 : e1-7.
- Makino H, Miyamoto Y, Sawai K, Mori K, Mukoyama M, Nakao K, Yoshimasa Y, Suga S. Altered gene expression related to glomerulogenesis and podocyte structure in early diabetic nephropathy of db/db mice and its restoration by pioglitazone. *Diabetes* 2006 ; 55 : 2747-2756.
- Isoe T, Makino Y, Mizumoto K, Sakagami H, Fujita Y, Honjo J, Takiyama Y, Itoh H, Haneda M. High glucose activates HIF-1-mediated signal transduction in glomerular mesangial cells through a carbohydrate response element binding protein. *Kidney Int* 2010 ; 78 : 48-59.
- Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, Arnot D, Uyeda K. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 9116-9121.