

特集：腎線維化

腎線維化と低酸素の薬物療法

Therapeutic approaches targeting fibrosis and hypoxia in the kidney

田中 哲洋 南学 正臣

Tetsuhiro TANAKA and Masaomi NANGAKU

はじめに

慢性進行性腎障害ではその原疾患にかかわらず、病態がある一定の閾値を超えるとその進行は不可逆となり、共通の病態経路を介して末期腎不全に至る。ヒトの腎生検標本を用いた組織学的解析により、残存腎機能は糸球体障害よりも尿細管・間質障害の程度とより強く相関することが知られているが¹⁾、近年、尿細管間質障害の背景に潜む共通病態進展因子として慢性低酸素状態が重要であることが認識されるようになった²⁾。

慢性腎臓病(CKD)における尿細管慢性低酸素状態とその成因

腎臓は、心拍出量全体の20～25%の血液を受け取る血流が豊富な臓器である。一方、腎臓で消費される酸素の量はそのうち約10%程度にすぎないが³⁾、腎臓はナトリウムや糖の再吸収のためにエネルギー需要が高い臓器でもある。

腎皮質における尿細管間質への酸素供給は、糸球体の下流にある輸出細動脈を経て傍尿細管毛細血管(peritubular capillary: PTC)に灌流する血液によって行われており、この血流によって近位および遠位曲尿細管での再吸収が支えられている。対照的に髄質では直細動脈(vasa recta)が還流し、また傍髄質糸球体周囲のシャント血流がヘンレのループや集合管に流れ込む。尿細管周囲では、上行・下行直細血管が皮質から髄質に伴走するため、酸素が毛細血管を介さずに直接流入する(動静脈酸素シャント)。結果、腎臓では酸素の取り込み効率が低下している。

このような理由から腎臓は生理的に低酸素状態にあり、

腎組織での酸素分圧は皮質で30～60 mmHg、髄質で10～15 mmHgと報告されている⁴⁾。それに呼応して、低酸素誘導因子(hypoxia-inducible factor: HIF)の活性を検出する遺伝子改変ラット⁵⁾やHIF蛋白の安定化状態を検出する遺伝子改変マウス⁶⁾を用いて腎臓の低酸素評価を行うと、髄質外層から髓放線にかけて低酸素領域が検出される。さらに腎実質障害が加わると、血流低下やその他後述の機序により、皮質尿細管は容易に低酸素状態に陥る。近年、非侵襲的なblood oxygenation level-dependent(BOLD)-MRIによってヒト腎臓の酸素化に関する評価が行われるようになり、慢性糸球体腎炎症例において腎皮質広範に低酸素領域が波及することが明らかになった⁷⁾。腎臓は他臓器と比較しても低酸素に対する感受性が高く、また障害を受けやすい臓器であると考えられる。

尿細管間質が低酸素に陥る機序は多岐にわたる。CKDでは、①PTCの脱落、②線維化による酸素拡散能の低下、③糸球体血流のうっ滞によるPTC血流の低下⁸⁾、④血管作動性物質のimbalance⁹⁾、⑤酸化ストレスによる尿細管ミトコンドリアの脱共役、⑥尿細管の酸素需要増大、⑦貧血による酸素運搬能の低下、などの要素が多数共在して低酸素状態が形成される。

PTCの脱落は進行期のCKDに共通して認められる特徴である。ヒト腎生検標本の解析により、毛細血管管腔の面積と血清クレアチニン値の間には負の相関関係があることが報告されている¹⁰⁾。また、5/6腎摘などの動物実験モデルにおいてもPTCの脱落は間質線維化と相関する¹¹⁾。

その一方で、尿細管局所における酸素消費も腎臓の低酸素に寄与する。尿細管における酸素消費量はNa再吸収量、ひいては糸球体濾過量によって規定されるが、近年の生理学的研究により、この尿細管での酸素消費(QO₂)とNa再吸収(TNa)の関係は可変的であり、高酸化ストレス状態や低

NO 状態, 高アンジオテンシン II (Ang II) 条件下などでは QO_2/TNa が増加することが明らかになってきた¹²⁾。例えば, SHR 高血圧自然発症ラットでは WKY ラットと比較して QO_2/TNa が有意に増加している¹³⁾。この増加はアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) によって打ち消された一方で, ヒドララジンなどの降圧コントロール群では変化を認めなかった¹⁴⁾。同様に, Ang II 持続注入モデルでも QO_2/TNa は増加したが, この酸素消費の亢進は酸化ストレスの除去によって打ち消された¹⁵⁾。また, 尿毒症物質であるインドキシル硫酸も, 初代培養尿細管細胞において Na-K-ATPase, NADPH oxidase 依存性に酸素消費量を亢進させる。in vivo においても, 尿毒症ラットに AST-120 を投与してインドキシル硫酸を除去すると, 低酸素検出試薬ピモニダゾールの陽性染色像が減弱し, 尿細管低酸素状態が改善することが示唆された¹⁶⁾。さらに糖尿病性腎症では, uncoupling protein-2 (UCP-2) の発現増加を伴う尿細管ミトコンドリアの脱共役が生じ, 酸素消費が亢進することが報告されている¹⁷⁾。つまり, 多くの CKD 症例において尿細管の酸素消費が亢進していることが推定され, 今後, 更なる知見の蓄積が期待される。

慢性低酸素障害と炎症・線維化

低酸素に陥った尿細管上皮は細胞増殖の変化や分化異常, アポトーシスを引き起こし, 失尿細管糸球体 (atubular glomeruli) を形成して機能ネフロンを減少させる。一方, 低酸素状態は直接的に線維芽細胞を活性化させ, コラーゲン I や tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 1 の mRNA 産生を亢進させる¹⁸⁾。また, 細胞系譜間連関を介する病態機序も重要であり, 例えば, 障害を受けた尿細管上皮は transforming growth factor (TGF)- β などのサイトカインを産生して尿細管周囲の線維化を促進する。同様に, 尿細管障害時に産生される血小板由来成長因子 (platelet derived growth factor : PDGF) は PTC 周囲の pericyte を活性化させる。活性化した pericyte は血管内皮から遊離して間質へと移動し, α SMA 陽性筋線維芽細胞に分化して線維化を進行させる¹⁹⁾。同時に, pericyte が遊離した毛細血管は脆弱となるため, PTC 減少が進行する。さらに, 腎臓の血管周囲ニッチに存在する Gli1 陽性間葉系幹細胞類似細胞も, 活性化線維芽細胞の起源として報告されている²⁰⁾。

糸球体疾患における病理組織学的な検討では, 尿細管の萎縮は線維化に先行して生じ, その萎縮した尿細管の周囲を線維芽細胞が増殖する像が観察される²¹⁾。また, 古典的

には急性腎障害 (acute kidney injury : AKI) で認められるような一過性短期の尿細管障害も, 反復して生じると, その周囲に線維化反応が引き起こされる²²⁾。さらに人工的なモデルではあるが, ジフテリア毒素受容体を尿細管上皮特異的に発現させ, マウスに同毒素を注射して人為的に尿細管特異的障害を引き起こしたところ, 単回の障害では炎症や尿細管上皮の増殖反応が見られ, 反復障害では PTC の減少や線維化が認められた²³⁾。これらの知見を総合すると, 線維化に至る間質の病理学的変化は, 大部分が尿細管障害によって惹起されうると考えられる。しかしながら一方で, ほかの構成成分である血管内皮細胞や炎症細胞の寄与も重要である。低酸素尿細管は血管透過性因子や炎症性サイトカインの産生を介して白血球浸潤を促進する。また, 障害領域に集簇したマクロファージは TGF- β などのサイトカインを放出して線維芽細胞を活性化させる。

これらの過程によって構築された線維化組織は, 血管と細胞間の酸素の拡散効率を低下させる。また, 低酸素と共存する炎症も局所の酸素需要を増大させ, また浮腫による毛細血管の圧迫や機能不全を起こすため, 低酸素を一層増悪させる²⁴⁾。

上記のように, 低酸素は CKD において共存する炎症や酸化ストレスと複雑に相互関連しながら尿細管障害・腎線維化を進行させる。しかしながらその一方で, 腎臓の低酸素状態自身がほかの交絡因子とは独立して腎障害の引き金となるという報告もされている。糖尿病性腎症モデルにジニトロフェノールを投与し, ミトコンドリアの脱共役によって尿細管酸素消費を亢進させたところ, 尿蛋白や尿細管間葉系マーカー (ビメンチン) の発現, 炎症細胞浸潤などが認められ, 腎症の惹起が示唆された²⁵⁾。これらの結果は CKD の病態惹起・進展における低酸素障害の重要性を示している。

低酸素誘導因子 (hypoxia-inducible factor : HIF)

低酸素に陥った尿細管間質はその環境に適応する過程で, 嫌気性エネルギー代謝や血管新生, 赤血球造血などに関与する遺伝子群を協調的に発現させる。その遺伝子発現を調節する主要因子が低酸素誘導因子 (hypoxia-inducible factor : HIF) である。HIF は basic helix-loop-helix-Per-Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-Sim (bHLH-PAS) ファミリーに属し, α 鎖と β 鎖から構成されるヘテロ二量体である。HIF の低酸素特異的な発現・機能は, α 鎖が酸素依存性に分解を受けることによる。酸素分子の存在

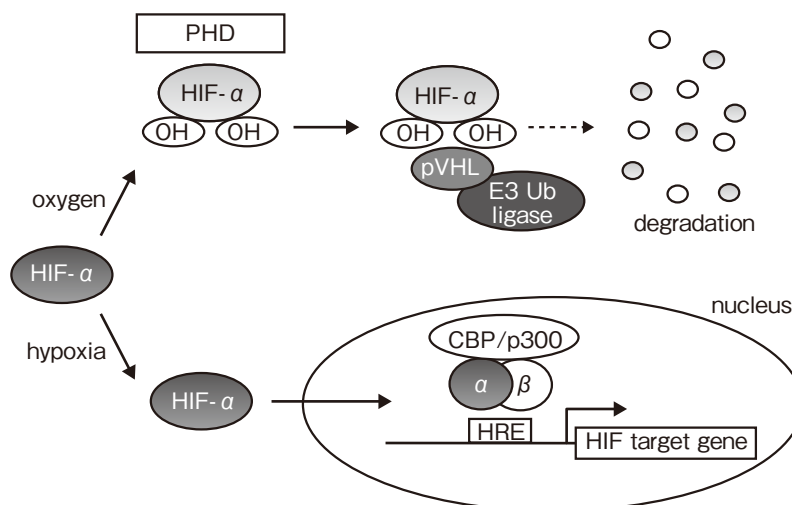


図1 低酸素誘導因子 HIF と PHD による発現制御

HIF- α は酸素分子の存在下でプロリン残基の水酸化を受ける。本反応は PHD によってもたらされ、その後ユビキチンリガーゼ複合体の構成成分である von Hippel-Lindau (pVHL) 蛋白が結合し、最終的にプロテアソーム分解を受ける。一方、低酸素条件では PHD が不活性であるため水酸化反応が起こらない。分解を逃れた HIF- α は細胞質から核へと移行し、 β 鎖とヘテロ二量体を形成し、HIF 標的遺伝子のエンハンサーに結合して転写を亢進させる。

PHD : prolyl hydroxylase domain-containing protein, プロリン水酸化酵素

下で α 鎖はプロリン残基(ヒト HIF-1 α の P402 と P564 に相当)が水酸化され、これが引き金となってユビキチンリガーゼ複合体の構成成分である von Hippel-Lindau (pVHL) 蛋白が結合し、プロテアソーム分解を受ける²⁶⁾。一方、低酸素下では水酸化反応が起こらないために、分解を逃れた α 鎖は細胞質から核へと移行し、 β 鎖とヘテロ二量体を形成し、HIF 標的遺伝子のエンハンサーに結合して転写を亢進させる(図1)。HIF- α には HIF-1 α 、HIF-2 α 、HIF-3 α のアイソフォームが存在し、それぞれ固有の機能を有している。HIF-1は全身の低酸素応答に関与する一方、HIF-2はその発現・機能が限局的であり、腎臓ではエリスロポエチン(EPO)産生に関与する。また、いくつかの HIF-3 splicing variants はほかの HIF を抑制すると考えられている。全身低酸素刺激や一酸化炭素(CO)吸入、腎虚血障害などに応じて、HIF-1が尿細管上皮に、HIF-2が血管内皮および間質に発現することが知られている²⁷⁾。

HIFの標的遺伝子は多岐にわたり、グルコース・エネルギー代謝関連遺伝子[例: glucose transporter 1 (GLUT1)]や血管新生因子[例: vascular-endothelial growth factor (VEGF)], 赤血球造血因子[例: EPO]などの古典的な低酸素適応因子群のほか、抗酸化因子、血管調節因子、鉄代謝関連因子、細胞外基質代謝関連因子、炎症関連因子、細胞増殖・細胞死調節因子など、100~200の遺伝子発現の制

御に関与する。さらに近年ではマイクロアレイ法やChIPシーケンスなどの大規模遺伝子発現解析技術が普及し、HIF標的遺伝子の網羅的解析が可能になった^{28,29)}。それに伴い腎症の病態制御に関与しうる新規 HIF 標的遺伝子の同定が進んでおり、その1例として sperm-associated antigen 4 (SPAG4)は低酸素下での cytokinesis を調節することが明らかになった³⁰⁾。

HIFの主要な標的遺伝子群、例えば EPO^{31~33)}や heme oxygenase-1 (HO-1)³⁴⁾などは虚血再灌流障害に対して保護的に働くことが知られている。本事実から推測されるように、HIFは腎臓の急性虚血障害に対して保護的に作用する。コバルト投与³⁵⁾や CO³⁶⁾・キセノン吸入³⁷⁾、PHD阻害薬(後述)³⁶⁾などによって HIF を障害惹起前に活性化しておくと、虚血再灌流障害時における急性尿細管壊死が軽減される。また逆に、HIF-1 α 、HIF-2 α ヘテロノックアウトマウスでは同障害が増悪する³⁸⁾。

1. CKD 環境における HIF の発現・機能修飾

CKDでは尿細管の低酸素状態を反映して、さまざまな程度の HIF の発現が認められる。尿細管上皮の HIF-1 α 核陽性像は、多くの実験 CKD モデル[腎実質障害³⁹⁾や糸球体硬化症⁵⁾、片側尿管結紮(UUO)モデル⁴⁰⁾など]において幅広く確認されるほか、ヒト糖尿病合併 CKD の腎生検標本においても認められている⁴¹⁾。しかしながら、その発現量や

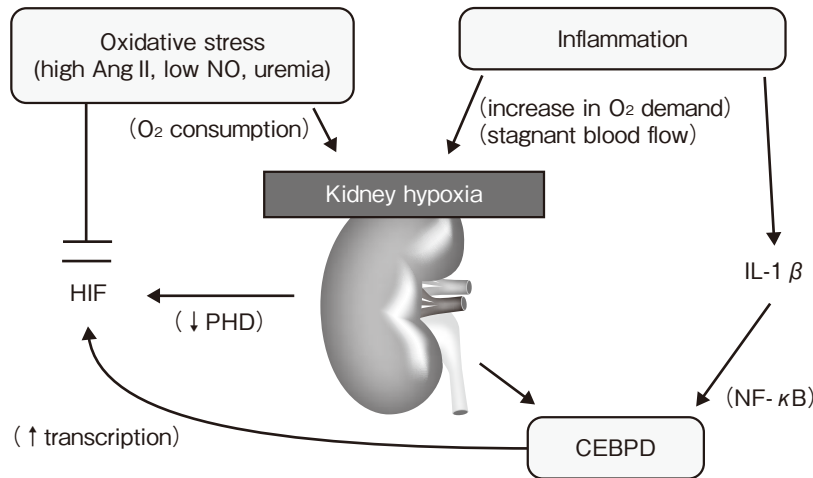


図2 CKDにおけるHIFの発現・機能修飾

CKDでは酸化ストレスや尿毒症物質などのさまざまな要因によって尿細管の酸素消費が高まり、低酸素環境が構築される。低酸素状態に陥った尿細管は、HIFを発現させることで環境適応応答を促進するが、その発現・機能は酸素濃度とは不相応に抑制されている。一方、低酸素状態や炎症によってNF-κB依存性にCEBPDが誘導され、転写の促進を介してHIF-1の発現を最適化している。

機能は低酸素の程度と照らし合わせると不十分である可能性も示唆されている。ストレプトゾトシン(STZ)誘発1型糖尿病モデルにおいて、尿細管のHIF-1 α および間質のHIF-2 α 陽性細胞数はSOD mimeticsであるテンポールの投与によって増加したことから、本モデルでは酸化ストレスがHIFの発現を抑制していると考えられた⁴²⁾。また、STZラットに虚血再灌流障害を施すと、虚血相におけるHIF標的遺伝子の発現が非糖尿病対照群と比較して有意に減少していた⁴³⁾。さらに、酸化ストレスがHIFを抑制する可能性は非糖尿病モデルであるブタ腎動脈狭窄モデルでも報告され、腎臓におけるHIF-1 α 蛋白およびVEGF蛋白の発現は、酸化ストレスを除去することによって同様に増加することが報告されている⁴⁴⁾。

酸化ストレス以外の要因でもHIFの発現・機能低下が生じる。CKDではmethylglyoxalの蓄積により蛋白の糖化修飾異常が生じるが、HIF-1 α の異常糖化により α/β ヘテロ二量体の形成が阻害されてHIFの機能不全が生じる⁴⁵⁾。また、インドキシル硫酸は培養肝細胞HepG2においてHIF-2 α の核成分を減少させ、低酸素によるEPO mRNAの発現誘導を低下させる。*in vivo*でもインドキシル硫酸の前駆体であるインドールをラットに前投与すると、腎臓のEPO mRNAおよび血漿EPO蛋白の低酸素誘導が減弱した⁴⁶⁾。従来より、尿毒症ラットでは低酸素刺激による腎臓EPO mRNAの発現誘導が減弱することが知られていたが⁴⁷⁾、本

現象が部分的には尿毒症物質によるHIFの発現低下によって説明されることが明らかとなった。さらに、尿毒症環境ではHIF-1に対する転写共因子の結合が阻害され、転写活性化能力が抑制される。MAPキナーゼ活性を介する転写抑制因子のmRNA安定化機構⁴⁸⁾のほか、末期腎不全患者の脂肪由来肝細胞ではp300/CBP-associated factor(PCAF)の発現が低下することから、HIF-1の機能が低下してVEGF依存血管新生反応が抑制されることも報告されている⁴⁹⁾。

2. 腎臓におけるHIFの調節因子

上記のように、HIFの発現・活性はCKDにおけるさまざまな環境要因によって修飾を受けている。しかしながら、分子レベルでの調節機構は長らく不明であった。そこで、腎臓におけるHIFの新規調節因子をshRNAライブラリーによってスクリーニングをしたところ、そのような因子としてCCAAT/enhancer-binding protein δ (CEBPD)が同定された⁵⁰⁾。ライブラリーは腎動脈狭窄モデルにおけるマイクロアレイ解析⁵¹⁾の結果から、発現が上昇した150遺伝子をターゲットとして作製し、これらをHeLa細胞に一過性トランスフェクションした際のHIF-1 α 蛋白やVEGFの発現をアウトプットとして評価したところ、CEBPD shRNAはHIF-1シグナルを最も有効に抑制していた。CEBPDは虚血腎において髄質外層の尿細管の核に強く発現し、5/6腎摘モデルをはじめとするさまざまなCKDモデルでもその発現が上昇していた。培養尿細管細胞において本因子をノック

ダウンしたところ、HIF-1 α およびVEGFやGLUT1などの標的遺伝子の発現量は一様に低下し、CEBPDによるHIF-1 α の発現調節はプロモーターへの直接結合による転写亢進機構によることが明らかになった。また、CEBPDはIL-1 β によってNF- κ b依存性に誘導され、それと並行してHIF-1 α 蛋白も誘導されたが、一方でCEBPDの非存在下では、IL-1 β によるHIF-1 α の発現誘導は認められなかった。よって、CEBPDは低酸素下でHIF-1の発現を最適化するのみならず、炎症条件下におけるHIF-1シグナルの活性化にも必須の因子であると考えられた(図2)。

低酸素を標的とする薬物治療の可能性

慢性低酸素状態が末期腎不全(ESKD)へのfinal common pathwayであることを考えると、低酸素による障害経路を標的とする薬物治療の可能性を模索することは合理的である。具体的な標的としては、尿細管低酸素そのものの改善、HIFの安定化による低酸素応答機構の活性化、低酸素と共存する炎症・酸化ストレスの抑制があげられる。

1. 尿細管低酸素の改善

前項「慢性腎臓病(CKD)における尿細管慢性低酸素状態とその成因」で述べた通り、尿細管が低酸素に陥る原因はさまざまであるが、そのうちのいくつかは、現在、実地臨床で使用されている薬剤によって改善が期待できる。

1) レニン・アンジオテンシン系(RAS)阻害薬

アンジオテンシン変換酵素(angiotensin converting enzyme: ACE)阻害薬やARBは蛋白尿を呈するCKDの治療に必須の治療薬である。本薬剤は糸球体輸出細動脈を優位に拡張させることから、PTCの血流を改善することが期待される。実験的には、ラット5/6腎摘の病初期においてARBが毛細血管径を拡張させ、同領域への血液灌流と酸素化を改善させたという報告がある⁹⁾。また、麻酔ラットにおいてプロトポルフィリンの燐光を用いて腎皮質の酸素化を測定したところ、ACE阻害薬およびARBによって酸素化が改善されることが明らかになった⁵²⁾。さらには、RAS阻害薬には酸化ストレスの軽減を介する尿細管酸素消費の抑制(前出)や低酸素状態の改善も期待される。

2) 赤血球造血刺激因子製剤(ESA)

日本人を対象とする後ろ向き研究により、貧血はESKDの独立したリスク因子であることが示されている⁵³⁾。EPOなどのESA製剤を用いた腎性貧血治療は、組織への酸素供給を増加させて低酸素を改善させ、腎症の進行を抑制できる可能性がある^{54,55)}。しかしながら、同治療コンセプトの

妥当性そのものや、あるいは同目的を達するために必要な貧血管理目標については一定の見解が得られていない。欧米で行われた大規模介入試験(多くは目標Hb値9~11 g/dLとHb>12~13 g/dLを比較した)では、ESA製剤によってHb値を完全に正常化させても腎機能の低下は抑制できず、むしろ心血管イベントを増加させる結果となった^{56~58)}。一方で、後に行われた日本人を対象とするランダム化比較試験では、有意差はないものの、高Hb群(11~13 g/dL)にて血清Crの倍化や透析の開始、腎移植や死亡などのエンドポイントが抑制される傾向にあった⁵⁹⁾。欧米と本邦では心疾患の合併率や高血圧治療状況、腎代替療法開始時期をはじめとする腎死の定義など、実地臨床の慣習が異なる部分も多く、今後更なる知見の積み重ねが必要である。

2. HIF活性化に基づくCKD治療応用の可能性

糖尿病性腎症をはじめとする多くのCKDの病態において、HIFの発現・活性が不適切に抑制されている状況証拠があること、HIFによる低酸素応答は細胞レベルでの環境応答に本質的に必要であること、HIF標的遺伝子の多くは虚血性疾患に対して障害保護的に働くこと、などを考慮すると、HIFの活性化による低酸素応答の最適化はCKDの病態進展を抑制できる可能性がある。

1) 低酸素センサー: PHD

HIF- α は酸素分子の存在下でプロリン残基の水酸化が行われ、ユビキチン分解を受けている(前出および図1)。この最初の反応を司る酵素がプロリン水酸化酵素(prolyl hydroxylase domain-containing protein: PHD)である^{60,61)}。PHDはFe(II) and 2-oxoglutarate dependent dioxygenase familyに属する酵素で、酸素に対するKm値(反応最大速度の1/2の値を実現させるような基質濃度)は100~250 μ Mであり、生体内組織O₂(10~30 μ M)と比較して十分に高いことから、生理的条件下でのPHD活性は酸素分子の利用可能性によって規定されている。したがって、PHDは生体内における低酸素センサーとして有効に機能する。高等哺乳類においては、PHD1, PHD2, PHD3のアイソフォームが報告されており、PHD2がHIF- α の水酸化(分解)に中心的な役割を果たしている⁶²⁾。これらのPHDは臓器間で発現量の絶対値に差があるものの、すべての臓器に発現しており⁶³⁾、腎臓では皮質の遠位曲尿細管、髄質のヘンレの太い上行脚、集合管に強く発現している⁶⁴⁾。細胞内ではPHD1は核に、PHD2は細胞質に、PHD3は核および細胞質に局在している⁶⁵⁾。

2) PHD阻害薬による腎症治療応用

HIFの活性化はEPOの産生や鉄吸収・鉄利用の適正化を

介して腎性貧血の改善をもたらす。この観点から現在、PHD 阻害薬が腎性貧血治療薬として開発されつつあり⁶⁶⁾、国内外にて保存期腎不全・末期腎不全患者を対象に第 II 相、第 III 相試験が進められている。

一方、HIF が CKD の病態に及ぼす影響に関しては、これまで主にコバルトや dimethylallylglycine (DMOG: 2-oxoglutarate analogue), L-mimosine などによる非特異的、あるいは生物学的利用能が高くない HIF 活性化手法で検討されてきた。これまでのところ、AKI における HIF の保護的な役割とは対照的に、CKD における HIF の役割は多面的であり、原疾患やその病期にも依存するようである。

片腎摘を組み合わせた進行性メサンギウム増殖性腎炎 (片腎摘 Thy-1.1 腎炎) では、コバルト投与による HIF 活性化は尿細管間質の線維化を有意に抑制した⁶⁷⁾。本知見は尿細管上皮のアポトーシス減少を伴っていた一方、PTC には影響を及ぼさなかった。同様にコバルト投与による HIF の活性化は、Habu 毒による糸球体障害モデルでも腎機能を改善した⁶⁸⁾。

さらに、非免疫原性糸球体疾患である 5/6 腎摘モデルにおいてコバルトを投与したところ、血管内皮細胞の増殖と PTC の保持がもたらされ、マクロファージ浸潤や尿細管アポトーシスを抑制することで尿細管間質障害を有意に軽減した。5/6 腎摘モデルにおける PTC の保持は HIF 標的遺伝子である VEGF¹¹⁾ や EPO⁶⁹⁾ の治療的投与実験においても報告されており、これらの因子の誘導によって説明される可能性もある。

5/6 腎摘モデルでの尿細管間質障害の改善は、DMOG⁷⁰⁾ や L-mimosine⁷¹⁾ など多様な HIF 活性化手法によっても詳細に検討されている。L-mimosine を用いた研究⁷¹⁾ では、5/6 腎摘ラットに長期 (第 2 ~ 12 週)、中期 (第 4 ~ 12 週)、後期 (第 8 ~ 12 週) に分けて HIF を活性化させたところ、腎機能や尿細管間質のコラーゲン III 沈着、マクロファージ浸潤は長期群で悪化した一方、中期群では改善し、後期群では変化を認めなかった。これらの結果により、治療としての HIF 活性化には至適な therapeutic window が存在することがわかった。また本モデルでは、HIF-1 およびその標的遺伝子 HO-1 が tubuloglomerular feedback を介して障害保護効果をもたらすことも報告されている⁷²⁾。

HIF の活性化は代謝性疾患による腎障害にも影響を及ぼす。STZ 誘発性 1 型糖尿病ラットにコバルトを投与して HIF を活性化させると、糸球体過剰濾過、蛋白尿が抑制され、尿細管間質障害が軽減した⁷³⁾。本効果は、尿細管上皮のミトコンドリア leak respiration を抑制することで尿細管

の酸素消費を減少させ、ひいては低酸素を改善することによってもたらされた。

上記とは対照的に、いくつかの遺伝子改変マウスによる検討では、HIF が向線維化因子として作用する可能性も示唆されている。近位尿細管特異的 HIF-1 α ノックアウトマウスに UUO モデルを作製すると、炎症細胞の浸潤と間質の線維化が軽減した。*in vitro* の検討において、尿細管上皮の HIF-1 が lysyl oxidase の発現を介して上皮・間質形質転換 (epithelial mesenchymal transdifferentiation: EMT) を惹起し、本機序を介して線維化を促進しているものと考えられた⁴¹⁾。腎線維化における EMT の寄与は、近年の遺伝子改変技術に基づく細胞系譜追跡実験では否定的⁷⁴⁾、あるいはきわめて限局的である⁷⁵⁾ という見解が主流になりつつあるが⁷⁶⁾、にもかかわらず、HIF 活性化の潜在的リスクに注意を喚起する重要な報告である。

一方で、ユビキチンプロモーター下に Vhlh 遺伝子をノックアウトし、HIF が全身性に活性化したマウスに UUO モデルを作製すると、炎症性マクロファージの浸潤と線維化が軽減されることが報告された⁷⁷⁾。炎症の抑制は骨髄系細胞の HIF 活性化によってもたらされ、マクロファージにおける CC ケモカイン受容体の発現低下を伴っていた。しかしながら骨髄系細胞単独の HIF 活性化では腎線維化の改善には至らず、おそらくは腎構成細胞における HIF の活性化が必要であると考えられた。つまり、HIF の活性化が及ぼす腎帰結はその構成細胞ごとに異なる可能性が示唆された。PHD 阻害薬の登場によって、従来困難であった持続的かつ特異的な HIF の活性化が可能になりつつある。PHD 阻害薬を用いた腎症改善効果の検討例は、現時点では限定的であるが、これまでにラット³⁶⁾ やマウス⁷⁸⁾ の虚血再灌流障害や Fisher-Lewis ラット腎移植モデル⁷⁹⁾ などで検討されてきた。腎移植モデルでは、ドナー腎臓に PHD 阻害薬を前投与したところ、移植後急性期の尿細管壊死スコアが軽減し、移植片の長期生存率も有意に改善した。また、マウスの虚血再灌流障害を用いた検討では、PHD 阻害薬による尿細管障害の軽減は血管内皮特異的 HIF-2 α ノックアウトマウスで消失したことから、PHD 阻害薬による腎保護作用は血管内皮の HIF-2 によってもたらされることが推定された。一方で今日に至るまで、障害の主座である尿細管上皮、とりわけ近位尿細管の HIF-1 が障害の改善に与える影響は不明であり、今後の検討課題である。

虚血再灌流障害を長期観察すると、腎線維化モデル (AKI to CKD) になる。同モデルに PHD 阻害薬を前投与すると急性期障害が軽くなることから、その後の線維化が軽減され

ると予想される。一方で HIF の活性化が尿細管増殖・再分化といった尿細管の回復プロセスを促進できるのか、その結果として虚血(毛細血管網の脱落)や線維化を改善することができるのかといった、より臨床治療応用に近いレベルでの問題点は未知であり、同様に今後の検討が待たれる。いずれにせよ、実験医学的な HIF の長期安定化手法はようやく可能になりつつある段階であり、今後、HIF の活性化による CKD 病態改善効果の検証が進むことを期待したい。

上記のような待望論の一方で、PHD 阻害薬には HIF の活性化に伴う腫瘍進展リスクに対する懸念もある。腎細胞癌では、HIF-2 が腫瘍の aggressive phenotype に関与すると考えられているが⁸⁰⁾、人工的に遠位尿細管特異的に HIF-2 を過剰発現させたマウスでは発癌を認めていない⁸¹⁾。にもかかわらず、PHD 阻害および HIF 活性化における長期的安全性の担保は、腎性貧血治療のみならず CKD 治療応用を考えるうえできわめて重要な課題であることは論を待たない。

3. 炎症・酸化ストレスを標的とする薬物療法

炎症と酸化ストレスは低酸素障害と密接に関連し、CKD においてもその抑制が病態改善につながると期待される。bardoxolone methyl は生体内のストレス防御機構である nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) を活性化し、抗酸化ストレス・抗炎症関連遺伝子の発現を誘導する。本剤は第 II 相試験において推定糸球体濾過量 (eGFR) を上昇させたが⁸²⁾、その後のステージ 4 の 2 型糖尿病合併 CKD 患者を対象とした第 III 相試験では、eGFR 上昇は確認されたものの、体液貯留による心不全などの心血管イベント発生率が高く、9 カ月で中止となった (BEACON 試験)⁸³⁾。しかしながら本研究における心不全症例の多くは、過去に心不全入院歴がありベースラインの BNP 値が高い傾向にあったことや、投与開始後 4 週間以内に体重増加、浮腫、血圧上昇が顕在化するなど、いくつかの共通する特徴が認められた。一方、本邦で行われていた第 II 相試験 (BEACON 試験の結果を受けて中断) では安全上の問題点は指摘されておらず、体液貯留の副作用は慎重な経過観察にて予知可能と判断されたことから、心不全リスクを有する患者を除外し、イベントリスクがより低いと想定されるステージ 3 の CKD 合併 2 型糖尿病患者を対象として、国内第 II 相試験 (TSUBAKI study) が再開されている。

引き起こす。低酸素誘導因子 HIF による低酸素適応機構は CKD の病態制御に深く関与すると考えられるが、共存する酸化ストレスや尿毒症物質などのさまざまな要因により、発現・機能面での修飾を受けている。近年、HIF の活性化に基づく新規腎性貧血治療薬として PHD 阻害薬が開発され、国内外で第 II 相、第 III 相試験が進行中である。PHD 阻害薬を用いた虚血性臓器障害、とりわけ低酸素を共通背景に有する CKD の障害保護効果に対する関心が高まりつつあり、今後、同コンセプトの検証に期待が寄せられる。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

1. Mackensen-Haen S, Bader R, Grund KE, Bohle A. Correlations between renal cortical interstitial fibrosis, atrophy of the proximal tubules and impairment of the glomerular filtration rate. *Clin Nephrol* 1981 ; 15 : 167-171.
2. Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury : a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 17-25.
3. Evans RG, Gardiner BS, Smith DW, O'Connor PM. Intrarenal oxygenation : unique challenges and the biophysical basis of homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008 ; 295 : F1259-1270.
4. Brezis M, Rosen S. Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease. *N Engl J Med* 1995 ; 332 : 647-655.
5. Tanaka T, Miyata T, Inagi R, Fujita T, Nangaku M. Hypoxia in renal disease with proteinuria and/or glomerular hypertension. *Am J Pathol* 2004 ; 165 : 1979-1992.
6. Safran M, Kim WY, O'Connell F, Flippin L, Gunzler V, Horner JW, Depinho RA, Kaelin WG Jr. Mouse model for noninvasive imaging of HIF prolyl hydroxylase activity : assessment of an oral agent that stimulates erythropoietin production. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 105-110.
7. Inoue T, Kozawa E, Okada H, Inukai K, Watanabe S, Kikuta T, Watanabe Y, Takenaka T, Katayama S, Tanaka J, Suzuki H. Noninvasive evaluation of kidney hypoxia and fibrosis using magnetic resonance imaging. *J Am Soc Nephrol* 2011 ; 22 : 1429-1434.
8. Matsumoto M, Tanaka T, Yamamoto T, Noiri E, Miyata T, Inagi R, Fujita T, Nangaku M. Hypoperfusion of peritubular capillaries induces chronic hypoxia before progression of tubulointerstitial injury in a progressive model of rat glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2004 ; 15 : 1574-1581.
9. Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, Ohse T, Miyata T, Inagi R, Kurokawa K, Fujita T, Nangaku M. Evidence of tubular hypoxia in the early phase in the remnant kidney model. *J Am Soc Nephrol* 2004 ; 15 : 1277-1288.
10. Bohle A. Change of paradigms in nephrology--a view back and a look forward. *Nephrol Dial Transplant* 1998 ; 13 : 556-563.
11. Kang DH, Hughes J, Mazzali M, Schreiner GF, Johnson RJ. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model : II. Vascular

おわりに

尿細管慢性低酸素は CKD の final common pathway であり、炎症や酸化ストレスと相互関連しながら間質線維化を

- endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. *J Am Soc Nephrol* 2001 ; 12 : 1448-1457.
12. Palm F, Teerlink T, Hansell P. Nitric oxide and kidney oxygenation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009 ; 18 : 68-73.
 13. Welch WJ, Baumgärtl H, Lübbers D, Wilcox CS. Nephron pO₂ and renal oxygen usage in the hypertensive rat kidney. *Kidney Int* 2001 ; 59 : 230-237.
 14. Welch WJ, Baumgärtl H, Lübbers D, Wilcox CS. Renal oxygenation defects in the spontaneously hypertensive rat : role of AT1 receptors. *Kidney Int* 2003 ; 63 : 202-208.
 15. Welch WJ, Blau J, Xie H, Chabrashvili T, Wilcox CS. Angiotensin-induced defects in renal oxygenation : role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005 ; 288 : H22-28.
 16. Palm F, Nangaku M, Fasching A, Tanaka T, Nordquist L, Hansell P, Kawakami T, Nishijima F, Fujita T. Uremia induces abnormal oxygen consumption in tubules and aggravates chronic hypoxia of the kidney via oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010 ; 299 : F380-386.
 17. Friederich M, Fasching A, Hansell P, Nordquist L, Palm F. Diabetes-induced up-regulation of uncoupling protein-2 results in increased mitochondrial uncoupling in kidney proximal tubular cells. *Biochim Biophys Acta* 2008 ; 1777 : 935-940.
 18. Norman JT, Clark IM, Garcia PL. Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts. *Kidney Int* 2000 ; 58 : 2351-2366.
 19. Chen YT, Chang FC, Wu CF, Chou YH, Hsu HL, Chiang WC, Shen J, Chen YM, Wu KD, Tsai TJ, Duffield JS, Lin SL. Platelet-derived growth factor receptor signaling activates pericyte-myofibroblast transition in obstructive and post-ischemic kidney fibrosis. *Kidney Int* 2011 ; 80 : 1170-1181.
 20. Kramann R, Schneider RK, DiRocco DP, Machado F, Fleig S, Bondzie PA, Henderson JM, Ebert BL, Humphreys BD. Perivascular Gli1+ progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis. *Cell Stem Cell* 2015 ; 16 : 51-66.
 21. Kriz W, LeHir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. *Kidney Int* 2005 ; 67 : 404-419.
 22. Nath KA, Croatt AJ, Haggard JJ, Grande JP. Renal response to repetitive exposure to heme proteins : chronic injury induced by an acute insult. *Kidney Int* 2000 ; 57 : 2423-2433.
 23. Grgic I, Campanholle G, Bijol V, Wang C, Sabbiseti VS, Ichimura T, Humphreys BD, Bonventre JV. Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2012 ; 82 : 172-183.
 24. Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med* 2011 ; 364 : 656-665.
 25. Friederich-Persson M, Thörn E, Hansell P, Nangaku M, Levin M, Palm F. Kidney hypoxia, attributable to increased oxygen consumption, induces nephropathy independently of hyperglycemia and oxidative stress. *Hypertension* 2013 ; 62 : 914-919.
 26. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999 ; 399 : 271-275.
 27. Rosenberger C, Mandriota S, Jürgensen JS, Wiesener MS, Hörstrup JH, Frei U, Ratcliffe PJ, Maxwell PH, Bachmann S, Eckardt KU. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and -2 α in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2002 ; 13 : 1721-1732.
 28. Mole DR, Blancher C, Copley RR, Pollard PJ, Gleadle JM, Ragoussis J, Ratcliffe PJ. Genome-wide association of hypoxia-inducible factor(HIF)-1 α and HIF-2 α DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem* 2009 ; 284 : 16767-16775.
 29. Mimura I, Nangaku M, Kanki Y, Tsutsumi S, Inoue T, Kohro T, Yamamoto S, Fujita T, Shimamura T, Suehiro J, Taguchi A, Kobayashi M, Tanimura K, Inagaki T, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Aburatani H, Kodama T, Wada Y. Dynamic change of chromatin conformation in response to hypoxia enhances the expression of GLUT3(SLC2A3) by cooperative interaction of hypoxia-inducible factor 1 and KDM3A. *Mol Cell Biol* 2012 ; 32 : 3018-3032.
 30. Shoji K, Murayama T, Mimura I, Wada T, Kume H, Goto A, Ohse T, Tanaka T, Inagi R, van der Hoorn FA, Manabe I, Homma Y, Fukayama M, Sakurai T, Hasegawa T, Aburatani H, Kodama T, Nangaku M. Sperm-associated antigen 4, a novel hypoxia-inducible factor 1 target, regulates cytokinesis, and its expression correlates with the prognosis of renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2013 ; 182 : 2191-2203.
 31. Yang CW, Li C, Jung JY, Shin SJ, Choi BS, Lim SW, Sun BK, Kim YS, Kim J, Chang YS, Bang BK. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *FASEB J* 2003 ; 17 : 1754-1755.
 32. Vesey DA, Cheung C, Pat B, Endre Z, Gobé G, Johnson DW. Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 2004 ; 19 : 348-355.
 33. Sharples EJ, Patel N, Brown P, Stewart K, Mota-Philipe H, Sheaff M, Kieswich J, Allen D, Harwood S, Raftery M, Thiernemann C, Yaqoob MM. Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 2004 ; 15 : 2115-2124.
 34. Tracz MJ, Juncos JP, Croatt AJ, Ackerman AW, Grande JP, Knutson KL, Kane GC, Terzic A, Griffin MD, Nath KA. Deficiency of heme oxygenase-1 impairs renal hemodynamics and exaggerates systemic inflammatory responses to renal ischemia. *Kidney Int* 2007 ; 72 : 1073-1080.
 35. Matsumoto M, Makino Y, Tanaka T, Tanaka H, Ishizaka N, Noiri E, Fujita T, Nangaku M. Induction of renoprotective gene expression by cobalt ameliorates ischemic injury of the kidney in rats. *J Am Soc Nephrol* 2003 ; 14 : 1825-1832.
 36. Bernhardt WM, Câmpean V, Kany S, Jürgensen JS, Weidemann A, Warnecke C, Arend M, Klaus S, Günzler V, Amann K, Willam C, Wiesener MS, Eckardt KU. Preconditional activation of

- hypoxia-inducible factors ameliorates ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 1970-1978.
37. Ma D, Lim T, Xu J, Tang H, Wan Y, Zhao H, Hossain M, Maxwell PH, Maze M. Xenon preconditioning protects against renal ischemic-reperfusion injury via HIF-1 α activation. *J Am Soc Nephrol* 2009 ; 20 : 713-720.
38. Hill P, Shukla D, Tran MG, Aragonés J, Cook HT, Carmeliet P, Maxwell PH. Inhibition of hypoxia inducible factor hydroxylases protects against renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2008 ; 19 : 39-46.
39. Goldfarb M, Rosenberger C, Abassi Z, Shina A, Zilbersat F, Eckardt KU, Rosen S, Heyman SN. Acute-on-chronic renal failure in the rat : functional compensation and hypoxia tolerance. *Am J Nephrol* 2006 ; 26 : 22-33.
40. Tanaka T, Nangaku M. Angiogenesis and hypoxia in the kidney. *Nat Rev Nephrol* 2013 ; 9 : 211-222.
41. Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, Saito Y, Johnson RS, Kretzler M, Cohen CD, Eckardt KU, Iwano M, Haase VH. Hypoxia promotes fibrogenesis *in vivo* via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2007 ; 117 : 3810-3820.
42. Rosenberger C, Khamaisi M, Abassi Z, Shilo V, Weksler-Zangen S, Goldfarb M, Shina A, Zibertrest F, Eckardt KU, Rosen S, Heyman SN. Adaptation to hypoxia in the diabetic rat kidney. *Kidney Int* 2008 ; 73 : 34-42.
43. Katavetin P, Miyata T, Inagi R, Tanaka T, Sassa R, Ingelfinger JR, Fujita T, Nangaku M. High glucose blunts vascular endothelial growth factor response to hypoxia via the oxidative stress-regulated hypoxia-inducible factor/hypoxia-responsible element pathway. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 1405-1413.
44. Zhu XY, Chade AR, Rodriguez-Porcel M, Bentley MD, Ritman EL, Lerman A, Lerman LO. Cortical microvascular remodeling in the stenotic kidney : role of increased oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 ; 24 : 1854-1859.
45. Ceradini DJ, Yao D, Grogan RH, Callaghan MJ, Edelstein D, Brownlee M, Gurtner GC. Decreasing intracellular superoxide corrects defective ischemia-induced new vessel formation in diabetic mice. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 10930-10938.
46. Chiang CK, Tanaka T, Inagi R, Fujita T, Nangaku M. Indoxyl sulfate, a representative uremic toxin, suppresses erythropoietin production in a HIF-dependent manner. *Lab Invest* 2011 ; 91 : 1564-1571.
47. Tan CC, Eckardt KU, Ratcliffe PJ. Organ distribution of erythropoietin messenger RNA in normal and uremic rats. *Kidney Int* 1991 ; 40 : 69-76.
48. Tanaka T, Yamaguchi J, Higashijima Y, Nangaku M. Indoxyl sulfate signals for rapid mRNA stabilization of Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 2 (CITED2) and suppresses the expression of hypoxia-inducible genes in experimental CKD and uremia. *FASEB J* 2013 ; 27 : 4059-4075.
49. Yamanaka S, Yokote S, Yamada A, Katsuoka Y, Izuhara L, Shimada Y, Omura N, Okano HJ, Ohki T, Yokoo T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in long-term dialysis patients display downregulation of PCAF expression and poor angiogenesis activation. *PLoS One* 2014 ; 9 : e102311.
50. Yamaguchi J, Tanaka T, Eto N, Nangaku M. Inflammation and hypoxia linked to renal injury by CCAAT/enhancer-binding protein delta. *Kidney Int* 2015 ; 88 : 262-275.
51. Kojima I, Tanaka T, Inagi R, Nishi H, Aburatani H, Kato H, Miyata T, Fujita T, Nangaku M. Metallothionein is upregulated by hypoxia and stabilizes hypoxia-inducible factor in the kidney. *Kidney Int* 2009 ; 75 : 268-277.
52. Norman JT, Stidwill R, Singer M, Fine LG. Angiotensin II blockade augments renal cortical microvascular pO₂ indicating a novel, potentially renoprotective action. *Nephron Physiol* 2003 ; 94 : 39-46.
53. Iseki K, Ikemiya Y, Iseki C, Takishita S. Haematocrit and the risk of developing end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2003 ; 18 : 899-905.
54. Kuriyama S, Tomonari H, Yoshida H, Hashimoto T, Kawaguchi Y, Sakai O. Reversal of anemia by erythropoietin therapy retards the progression of chronic renal failure, especially in nondiabetic patients. *Nephron* 1997 ; 77 : 176-185.
55. Gouva C, Nikolopoulos P, Ioannidis JP, Siamopoulos KC. Treating anemia early in renal failure patients slows the decline of renal function : a randomized controlled trial. *Kidney Int* 2004 ; 66 : 753-760.
56. Drüeke TB, Locatelli F, Clyne N, Eckardt KU, Macdougall IC, Tsakiris D, Burger HU, Scherhag A; CREATE Investigators. Normalization of hemoglobin level in patients with chronic kidney disease and anemia. *N Engl J Med* 2006 ; 355 : 2071-2084.
57. Singh AK, Szczech L, Tang KL, Barnhart H, Sapp S, Wolfson M, Reddan D ; CHOIR Investigators. Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2006 ; 355 : 2085-2098.
58. Pfeffer MA, Burdmann EA, Chen CY, Cooper ME, de Zeeuw D, Eckardt KU, Feyzi JM, Ivanovich P, Kewalramani R, Levey AS, Lewis EF, McGill JB, McMurray JJ, Parfrey P, Parving HH, Remuzzi G, Singh AK, Solomon SD, Toto R ; TREAT Investigators. A trial of darbepoetin α in type 2 diabetes and chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2009 ; 361 : 2019-2032.
59. Tsubakihara Y, Gejyo F, Nishi S, Iino Y, Watanabe Y, Suzuki M, Saito A, Akiba T, Hirakata H, Akizawa T. High target hemoglobin with erythropoiesis-stimulating agents has advantages in the renal function of non-dialysis chronic kidney disease patients. *Ther Apher Dial* 2012 ; 16 : 529-540.
60. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzén E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001 ; 107 : 43-54.

61. Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans : the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* 2008 ; 30 : 393-402.
62. Berra E, Benizri E, Ginouvès A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J* 2003 ; 22 : 4082-4090.
63. Willam C, Maxwell PH, Nichols L, Lygate C, Tian YM, Bernhardt W, Wiesener M, Ratcliffe PJ, Eckardt KU, Pugh CW. HIF prolyl hydroxylases in the rat; organ distribution and changes in expression following hypoxia and coronary artery ligation. *J Mol Cell Cardiol* 2006 ; 41 : 68-77.
64. Schödel J, Klanke B, Weidemann A, Buchholz B, Bernhardt W, Bertog M, Amann K, Korbmacher C, Wiesener M, Warnecke C, Kurtz A, Eckardt KU, Willam C. HIF-prolyl hydroxylases in the rat kidney : physiologic expression patterns and regulation in acute kidney injury. *Am J Pathol* 2009 ; 174 : 1663-1674.
65. Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Bürgel T, Jelkmann W, Acker H, Fandrey J. Intracellular localisation of human HIF-1 α hydroxylases : implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* 2003 ; 116(Pt 7) : 1319-1326.
66. Bernhardt WM, Wiesener MS, Scigalla P, Chou J, Schmieder RE, Günzler V, Eckardt KU. Inhibition of prolyl hydroxylases increases erythropoietin production in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2010 ; 21 : 2151-2156.
67. Tanaka T, Matsumoto M, Inagi R, Miyata T, Kojima I, Ohse T, Fujita T, Nangaku M. Induction of protective genes by cobalt ameliorates tubulointerstitial injury in the progressive Thy1 nephritis. *Kidney Int* 2005 ; 68 : 2714-2725.
68. Kudo Y, Kakinuma Y, Mori Y, Morimoto N, Karashima T, Furihata M, Sato T, Shuin T, Sugiura T. Hypoxia-inducible factor-1 α is involved in the attenuation of experimentally induced rat glomerulonephritis. *Nephron Exp Nephrol* 2005 ; 100 : e95-103.
69. Bahlmann FH, Song R, Boehm SM, Mengel M, von Wasielewski R, Lindschau C, Kirsch T, de Groot K, Laudeley R, Niemczyk E, Güler F, Menne J, Haller H, Fliser D. Low-dose therapy with the long-acting erythropoietin analogue darbepoetin α persistently activates endothelial Akt and attenuates progressive organ failure. *Circulation* 2004 ; 110 : 1006-1012.
70. Song YR, You SJ, Lee YM, Chin HJ, Chae DW, Oh YK, Joo KW, Han JS, Na KY. Activation of hypoxia-inducible factor attenuates renal injury in rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant* 2010 ; 25 : 77-85.
71. Yu X, Fang Y, Ding X, Liu H, Zhu J, Zou J, Xu X, Zhong Y. Transient hypoxia-inducible factor activation in rat renal ablation and reduced fibrosis with L-mimosine. *Nephrology (Carlton)* 2012 ; 17 : 58-67.
72. Singh P, Blantz RC, Rosenberger C, Gabbai FB, Schoeb TR, Thomson SC. Aberrant tubuloglomerular feedback and HIF-1 α confer resistance to ischemia after subtotal nephrectomy. *J Am Soc Nephrol* 2012 ; 23 : 483-493.
73. Nordquist L, Friederich-Persson M, Fasching A, Liss P, Shoji K, Nangaku M, Hansell P, Palm F. Activation of hypoxia-inducible factors prevents diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2015 ; 26 : 328-338.
74. Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP, Duffield JS. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol* 2010 ; 176 : 85-97.
75. LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, Kalluri R. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med* 2013 ; 19 : 1047-1053.
76. Kriz W, Kaissling B, Le Hir M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis : fact or fantasy? *J Clin Invest* 2011 ; 121 : 468-474.
77. Kobayashi H, Gilbert V, Liu Q, Kapitsinou PP, Unger TL, Rha J, Rivella S, Schlöndorff D, Haase VH. Myeloid cell-derived hypoxia-inducible factor attenuates inflammation in unilateral ureteral obstruction-induced kidney injury. *J Immunol* 2012 ; 188 : 5106-5115.
78. Kapitsinou PP, Sano H, Michael M, Kobayashi H, Davidoff O, Bian A, Yao B, Zhang MZ, Harris RC, Duffy KJ, Erickson-Miller CL, Sutton TA, Haase VH. Endothelial HIF-2 mediates protection and recovery from ischemic kidney injury. *J Clin Invest* 2014 ; 124 : 2396-2409.
79. Bernhardt WM, Gottmann U, Doyon F, Buchholz B, Campean V, Schödel J, Reisenbuechler A, Klaus S, Arend M, Flippin L, William C, Wiesener MS, Yard B, Warnecke C, Eckardt KU. Donor treatment with a PHD-inhibitor activating HIFs prevents graft injury and prolongs survival in an allogenic kidney transplant model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 21276-21281.
80. Kondo K, Kim WY, Lechpammer M, Kaelin WG Jr. Inhibition of HIF2 α is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. *PLoS Biol* 2003 ; 1 : E83.
81. Schietke RE, Hackenbeck T, Tran M, Günther R, Klanke B, Warnecke CL, Knaup KX, Shukla D, Rosenberger C, Koesters R, Bachmann S, Betz P, Schley G, Schödel J, Willam C, Winkler T, Amann K, Eckardt KU, Maxwell P, Wiesener MS. Renal tubular HIF-2 α expression requires VHL inactivation and causes fibrosis and cysts. *PLoS One* 2012 ; 7 : e31034.
82. Pergola PE, Raskin P, Toto RD, Meyer CJ, Huff JW, Grossman EB, Krauth M, Ruiz S, Audhya P, Christ-Schmidt H, Wittes J, Warnock DG; BEAM Study Investigators. Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2011 ; 365 : 327-336.
83. de Zeeuw D, Akizawa T, Audhya P, Bakris GL, Chin M, Christ-Schmidt H, Goldsberry A, Houser M, Krauth M, Lambers Heerspink HJ, McMurray JJ, Meyer CJ, Parving HH, Remuzzi G, Toto RD, Vaziri ND, Wanner C, Wittes J, Wrolstad D, Chertow GM ; BEACON Trial Investigators. Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and stage 4 chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2013 ; 369 : 2492-2503.