

【各論】

HIF-PH 阻害薬と ESA の相違点
HIF-PH 阻害の分子機構*

南嶋洋司**

はじめに

個体の生存に酸素が必須であるわれわれの身体には、利用できる酸素が減少した低酸素環境においても個体や細胞が生存できるための「低酸素に対する生体応答反応（低酸素応答）」がプログラムされている。個体レベルの低酸素応答としては、限られた酸素を効率よく全身の臓器へと運搬するために必要な赤血球の造血およびそのために必要な鉄の吸収・運搬・利用の強化、あるいは赤血球が末梢組織へ到達するための血管の新生などが、一方で個々の細胞レベルでの低酸素応答としては、酸素に依存しない細胞内エネルギー代謝システムへのシフトなどが、それぞれよく知られている。

酸素には色も臭いもない。したがって、ヒトの感覚で酸素濃度の増減を感じるのは不可能であるが、動脈血中の酸素分圧の減少を頸動脈小体のグロムス細胞が感知し、中枢経由で呼吸数が増加するといった「秒単位での低酸素応答」については古くから研究されていた。しかしながら、低酸素環境下で必要となる遺伝子群の発現が誘導される分子メカニズムについては長らく未知のままであった。

1990 年代初頭になってようやく、低酸素環境で必要となる数々の遺伝子群の転写を司る転写因子 HIF (hypoxia-inducible factor) が同定され^{1,2)}、

低酸素応答の分子メカニズムの解明が急速に進みはじめ、2019 年にはこの研究領域を切り拓いてきた研究者 3 名にノーベル生理学医学賞が授与されるに至った³⁾。

I 低酸素応答のマスター・レギュレーター・
転写因子 HIF

HIF は、安定な β -サブユニット (HIF- β) と不安定な α -サブユニット (HIF- α) からなる転写因子である (図 1-a)。HIF- β は 1 つの遺伝子 ARNT から 1 つの蛋白が産生されるが、HIF- α には HIF-1 α 、HIF-2 α 、HIF-3 α の 3 つの蛋白が同定されており、それぞれ 3 つの別個の遺伝子 HIF1A、EPAS1、HIF3A から産生される (以後、便宜上、遺伝子名も蛋白名も HIF-1 α /2 α /3 α に統一する)⁴⁾ (図 1-b)。

HIF と表記すべきコンテキストで、HIF のことを HIF-1 あるいは HIF-1 α と連呼している総説や学会発表をよくみかける。転写因子 HIF のなかに HIF-1、HIF-2、HIF-3 があり、そのそれぞれが HIF-1 α と HIF-1 β 、HIF-2 α と HIF-2 β 、HIF-3 α と HIF-3 β から構成されていることを正しく理解しなくてはならない (図 1-c)。

HIF-3 α ノックアウトマウスは大きな表現型なく生まれてくるが、HIF-1 α ノックアウトマウスは胎生致死であり^{5,6)}、HIF-2 α ノックアウトマウスもほとんどの個体が胎生致死で、生まれた個体

* Molecular mechanism of HIF-PH inhibition and hypoxic response activation

key words : 低酸素、hypoxia、HIF、HIF-PH、PHD、EPO

** 群馬大学大学院医学系研究科 生化学講座 MINAMISHIMA Yoji Andrew

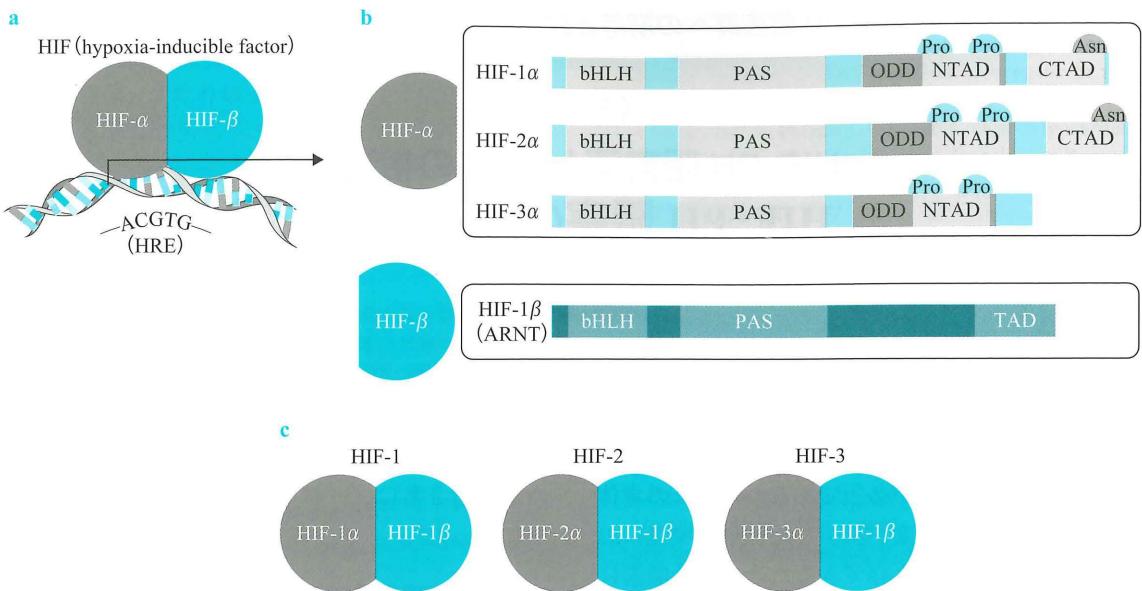


図1 転写因子 HIF の分類と構造

- a : HIF- α と HIF- β がヘテロダイマーを形成することで HIF は転写因子として機能する。
- b : HIF-1 α ～HIF-3 α と HIF- β の構造を示す。HIF-3 α には IPAS, NEPASなどを含む複数のスプライシング・バリアントが存在する。
- c : 転写因子 HIF の分類。HIF-1～HIF-3 の種類。
- Pro : proline 残基, Asn : asparagine 残基, bHLH : basic-helix-loop-helix, PAS : Per/Arnt/Sim, ODD domain : oxygen-dependent degradation domain, NTAD/CTAD : N/C-terminal transactivation domain, ARNT : aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator

も致死的な貧血を呈するため⁷⁾, HIF-1 α と HIF-2 α は発生に必要な分子と考えられている。

HIF-3 α は HIF-1 α や HIF-2 α と異なり C 末端側の転写活性化ドメイン (CTAD) を欠くこと (図1-b), HIF-3 α には HIF の転写活性を阻害するドミナントネガティブなスプライシング・バリアントも存在することなどから, HIF-3 は HIF の機能を抑制する方向に働くと理解されている。また, HIF-3 α 遺伝子を破壊しても胎生致死の表現型を示さない⁸⁾。そのため, 一般的に HIF と称した場合, HIF-1 や HIF-2 を指していることが多い。

最初にクローニングされたのが HIF-1 α だったためか, HIF-1 α のみを注視している論文や学会発表が多い。「この細胞は HIF-2 α を発現していない」といった科学的根拠を提示することなしに HIF-1 α 以外を無視することは, (それが科学である限り) 許されない。

II HIF の転写活性の酸素濃度依存的制御機構

HIF- β の蛋白発現量は酸素濃度にかかわらず安定だが, HIF- α の蛋白発現量は正常酸素濃度下 (normoxia) ではきわめて低く抑えられており, 低酸素環境下 (hypoxia) で蛋白発現量が急増する。すなわち, ここでいう低酸素応答とは, HIF- α の蛋白発現量によって制御される。

その HIF- α の蛋白量は, 転写ではなく主に蛋白の翻訳後修飾によって制御される。正常酸素濃度環境では, プロリン水酸化酵素 (EGLN/PHD/HIF-PH, 以後, HIF-PH と統一) によって HIF- α の特定のプロリン残基が酸素依存的に水酸化され, それを指標に HIF- α は pVHL (von Hippel-Lindau) を含むユビキチンリガーゼ (E3) によってユビキチン化されてプロテアソームでの蛋白分解へと導かれる (図2-a)。

一方, 低酸素環境では HIF-PH の酵素活性が低

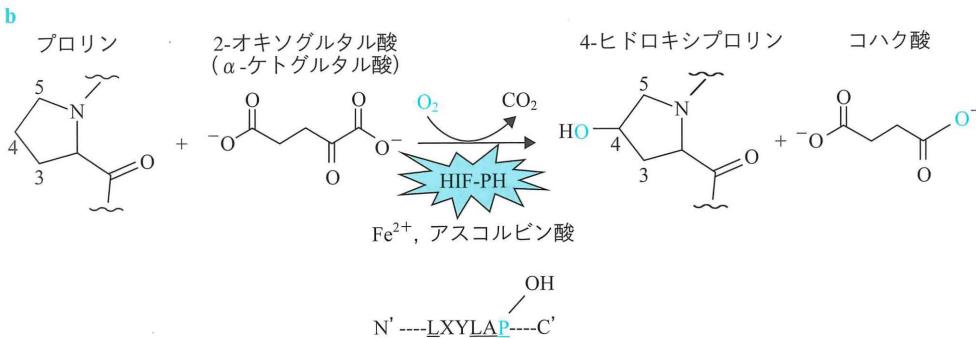
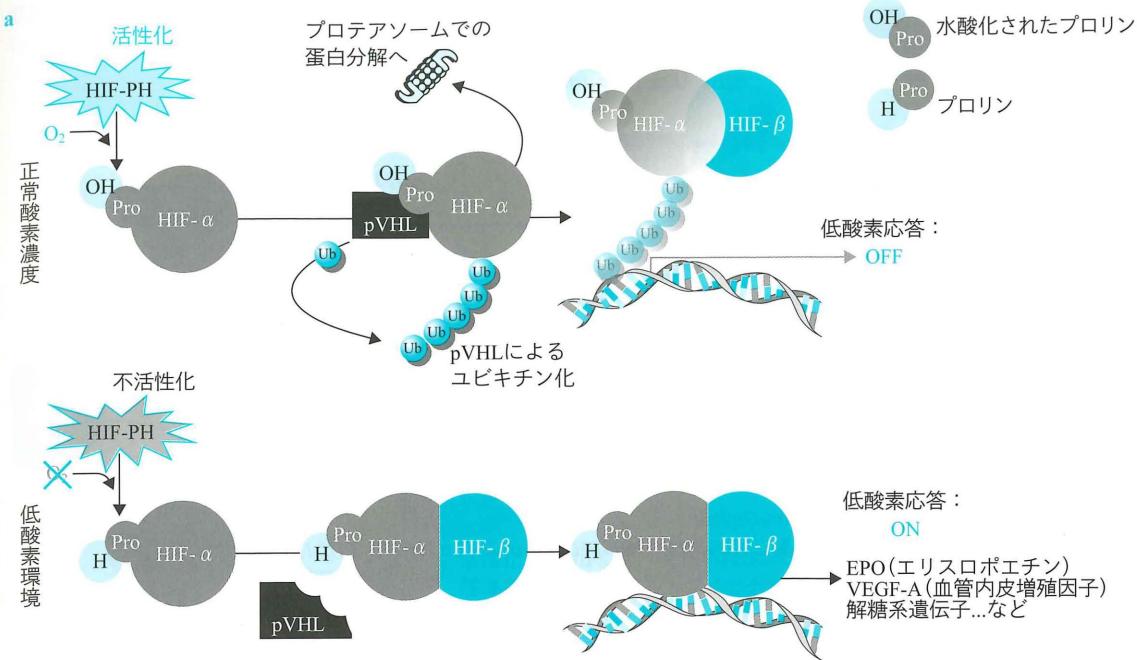


図 2 HIF-PH による HIF の制御メカニズム

- a : 酸素濃度依存的 HIF の活性化メカニズムを示す。HIF-PH の酵素活性が HIF を介して低酸素応答の ON/OFF を制御していることがわかる。
- b : 酸素依存的プロリンの水酸化。HIF-PH は、LXYLAP といったアミノ酸配列中のプロリン残基 (P) の 4 位の炭素を、酸素分子や 2-オキソグルタル酸を共基質として水酸化する。酸素濃度が HIF-PH の酸素分子に対する K_m 値以下まで低下すると HIF-PH の酵素活性が低下し、プロリン水酸化反応が抑制される。この反応にはアスコルビン酸 (ビタミン C) や 2 値の鉄も要求される。

下し、HIF- α のプロリン水酸化が抑制される。プロリン水酸化依存的蛋白分解を免れた HIF- α の蛋白発現量は急速に増加し、HIF- α は HIF- β とヘテロダイマーを形成し、ゲノミック DNA 上の HRE (hypoxia-responsive element) 配列に結合し、標的遺伝子の転写を開始する (図 2-a)。

HIF-PH は、酵素学的には 2-オキソグルタル酸

(α -ケトグルタル酸) や 2 値の鉄依存的なジオキシゲナーゼ (酸素添加酵素の一種) であり、その酵素活性に酸素分子を必要とする (図 2-b)。そのため、HIF-PH の「酸素に対する K_m 値」以下にまで酸素濃度が低下したような低酸素環境では酵素活性が低下してしまう。このように、われわれの身体の細胞は HIF-PH の酵素活性の強弱によっ

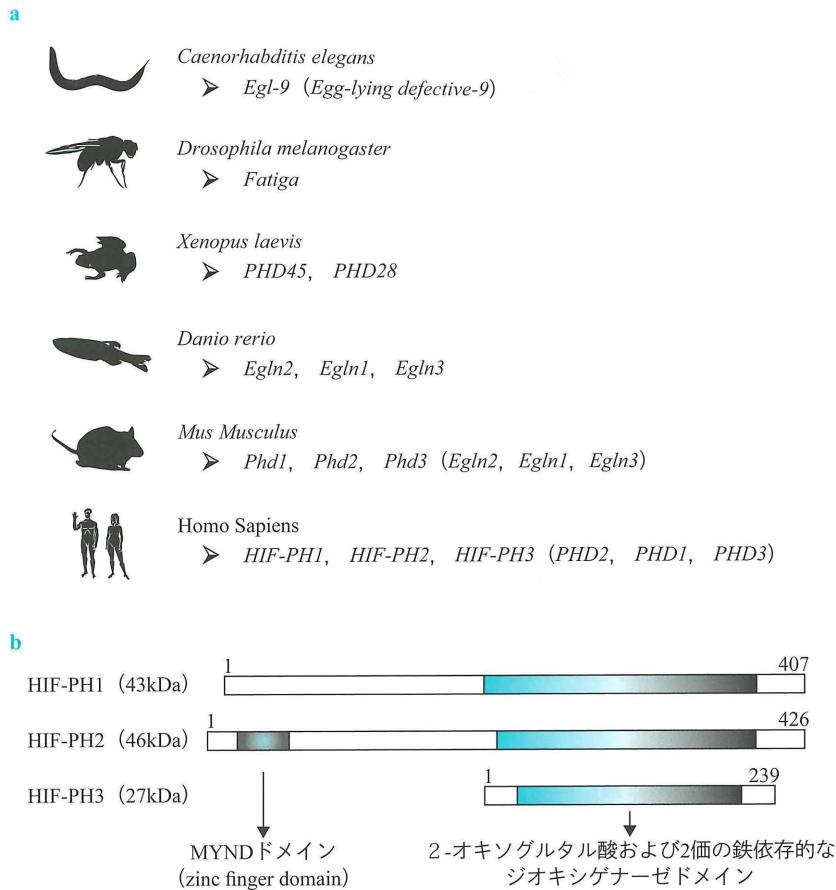


図3 さまざまな生物種における HIF-PH

- a** : HIF-PH は線虫から哺乳動物まで、種を超えて保存されていることがわかる。哺乳動物では複数の呼称が混在しており、HIF-PH1/2/3 および PHD1/2/3 と EGLN2/1/3 で番号が異なることに注意する。
EGLN : EGL-nine
- b** : HIF-PH1~3 の構造。酵素活性中心のアミノ酸配列はアイソザイム間で相同性が高いが、ドメイン構造や全長が分子間で若干異なる。

て酸素濃度を感じているのである。すなわち、転写因子 HIF を介した低酸素応答は、HIF-PH の酵素活性によって ON/OFF が制御されており、HIF-PH は「酸素濃度センサー」として機能していると理解されている。

HIF-PH の遺伝子は、酵母などの単細胞生物では同定されていない。彼らは別の方法で酸素濃度を感じているようである。一方で、後生動物 (metazoan) の間では、線虫 (*Egl-9*)、ショウジョウバエ (*Fatiga*)、アフリカツメガエル (*PHD45/28*)、ゼブラフィッシュ (*Egln2/1/3*)、およびわ

れわれ哺乳類 (*PHD1/2/3, HIF-PH1/2/3, or EGLN2/1/3*) などにおいて、種を超えて広く遺伝子が保存されている (図3-a, b)。哺乳動物の3つの HIF-PH のうち、HIF-PH2 (PHD2 or EGLN1) が主要な HIF-PH であり、3つの HIF-PH 遺伝子のうち HIF-PH2 遺伝子を破壊したマウスのみが胎生致死であるし、HIF-PH2 の活性さえ阻害すれば HIF- α のプロリン水酸化依存的な蛋白分解が抑制され、HIF- α の顕著な蓄積が観察される^{4,9,10}。

HIF-PH1 はエストロゲンによって誘導される

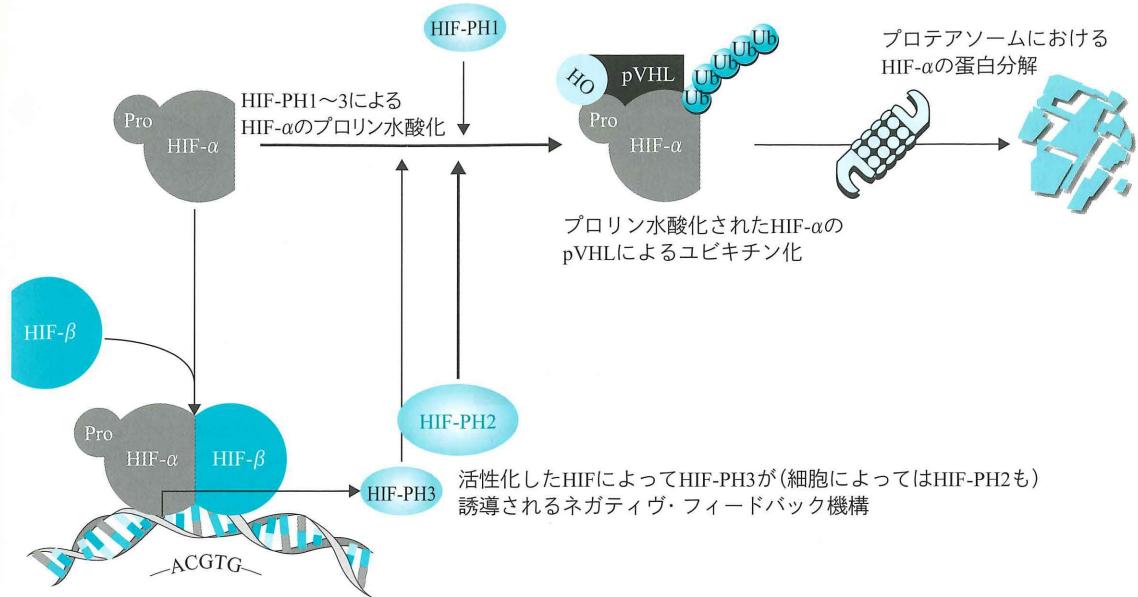


図4 HIF-PHによるHIFのネガティブ・フィードバック制御機構

低酸素によって HIF-PH の活性が低下し、プロリン水酸化依存的な HIF- α の蛋白分解が抑制されて HIF が活性化するが、活性化した HIF がまた HIF-PH3 を（細胞によっては HIF-PH2 も）誘導することで、HIF の無秩序な活性化を防いでいる。

分子として知られており、しかし一方では精巣での発現が唯一確認される HIF-PH である¹¹⁾。HIF-PH1 ノックアウトマウスでは乳腺上皮細胞における cyclin D1 の発現が低下し、妊娠時の乳腺組織の成熟遅延が観察される。HIF-PH1 の発現を抑えた乳癌細胞では cyclin D1 の発現が低下し、ヌードマウスの皮下に移植した腫瘍の増殖が抑制されるため、HIF-PH1 が乳癌の治療標的になりうる可能性について詳細な解析が期待される¹²⁾。HIF-PH3 は骨格筋・心筋・肝臓などでの発現が強いが、神経細胞においては酵素活性依存的にアポトーシスを誘導するようである¹³⁾。酸素濃度の低下に伴い HIF-PH3 の酵素活性が低下し、HIF の転写活性が上昇しはじめると、HIF-PH3 の発現が誘導される。酵素活性の減弱を発現量で補い、再び HIF- α を分解へと導こうとするかのような挙動を示すことから、われわれの身体には HIF の無秩序・恒常的な活性化を防がなくてはならない理由があり、そのために HIF-PH による

HIF に対するネガティブ・フィードバックループ機構が備わっているように思われる^{4,9)}（図4）。

III HIF-PH 阻害薬

2019 年以降、HIF-PH の酵素活性を阻害する薬剤（HIF-PH 阻害薬）が腎性貧血治療薬として承認され、本稿脱稿時点ではわが国では 5 剤が臨床の現場で使用されている。どの薬剤がどの HIF-PH アイソザイムを優先的に阻害するかには若干の差があり、どの HIF-PH アイソザイムがどの HIF- α のプロリン残基を優先的に水酸化して蛋白分解へと導くかにも若干の差はあるものの、基本的に HIF-PH 阻害薬は、同定されている 3 つの HIF-PH (HIF-PH1~3) すべての酵素活性を阻害し、酸素濃度にかかわらず HIF の転写活性を上昇させて、われわれの身体（特に腎臓と肝臓）を低酸素と勘違いさせ、低酸素応答を ON にする薬剤である¹⁴⁾。

これらの薬剤は、基本的に 2-オキソグルタル酸

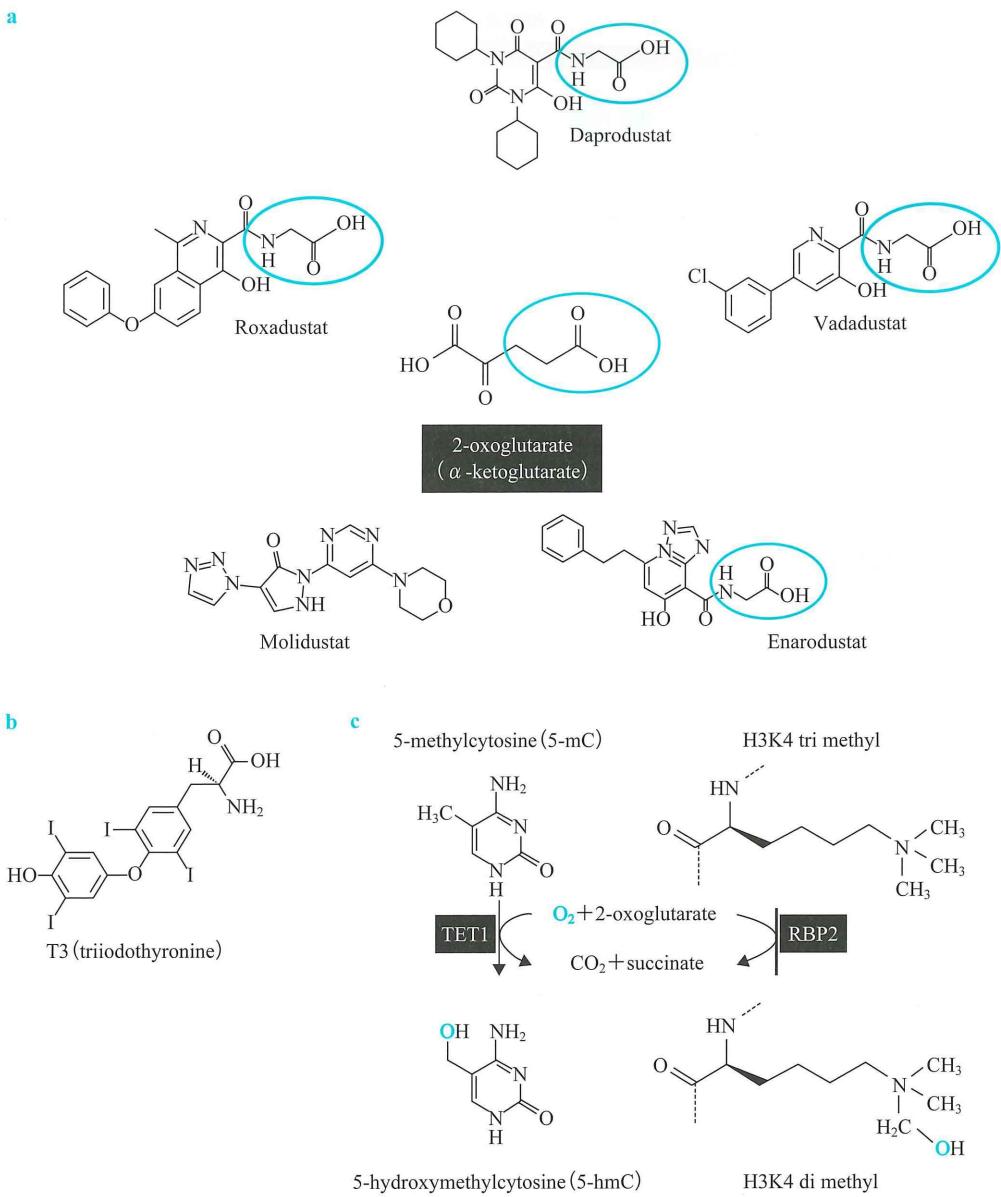


図 5 HIF-PH 阻害薬の分子構造

- a** : わが国の臨床現場で使用されている HIF-PH 阻害薬 5 剤と 2-オキソグルタル酸の分子構造。構造が類似している部位を色丸で図示した。
- b** : 甲状腺ホルモン T3 の分子構造。
- c** : DNA やヒストンの脱メチル化酵素の反応図。HIF-PH と同じく、2-オキソグルタル酸依存的な酸素添加酵素であることがわかる。

(α -ケトグルタル酸) の競合阻害薬であり、現在臨床で使用されている 5 剤中 4 剤は分子内に 2-オキソグルタル酸と類似した構造をもっている (図 5-a)。また、分子内に甲状腺ホルモン T3 (triiodo-

thyronine) と類似した構造を有する薬剤もある¹⁵⁾ (図 5-b)。そのため、(本来 off-target が少ない薬剤が承認されているはずではあるものの) ヒストンあるいは DNA の脱メチル化酵素 (図 5-c) と

といったほかの2-オキソグルタル酸依存ジオキシゲナーゼ群の酵素活性や、甲状腺ホルモンのシグナリングへのoff target効果など、臨床現場からの実臨床データに今後注視していく必要がある。

◆ おわりに

本稿では、新たに腎性貧血治療薬として承認されたHIF-PH阻害薬によって、どのような酵素が阻害され、その結果、生体内でどのようにして低酸素応答が活性化するのかを紹介した。

文 献

- 1) Wang GL, Semenza GL: Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem* **268**: 21513-21518, 1993
- 2) Wang GL, Semenza GL: General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 4304-4308, 1993
- 3) Ledford H, Callaway E: Biologists who decoded how cells sense oxygen win medicine Nobel. *Nature* **574**: 161-162, 2019
- 4) Minamishima YA, Moslehi J, Bardeesy N, et al: Somatic inactivation of the PHD2 prolyl hydroxylase causes polycythemia and congestive heart failure. *Blood* **111**: 3236-3244, 2008
- 5) Iyer NV, Kotch LE, Agani F, et al: Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1a. *Genes Dev* **12**: 149-162, 1998
- 6) Kotch LE, Iyer NV, Laughner E, et al: Defective vascularization of HIF-1a-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol* **209**: 254-267, 1999
- 7) Scortegagna M, Morris MA, Oktay Y, et al: The HIF family member EPAS1/HIF-2a is required for normal hematopoiesis in mice. *Blood* **102**: 1634-1640, 2003
- 8) Yamashita T, Ohneda O, Nagano M, et al: Abnormal heart development and lung remodeling in mice lacking the hypoxia-inducible factor-related basic helix-loop-helix PAS protein NEPAS. *Mol Cell Biol* **28**: 1285-1297, 2008
- 9) Minamishima YA, Moslehi J, Padera RF, et al: A feedback loop involving the Phd3 prolyl hydroxylase tunes the mammalian hypoxic response in vivo. *Mol Cell Biol* **29**: 5729-5741, 2009
- 10) Minamishima YA, Kaelin WG Jr: Reactivation of hepatic EPO synthesis in mice after PHD loss. *Science* **329**: 407, 2010
- 11) Lieb ME, Menzies K, Moschella MC, et al: Mammalian EGLN genes have distinct patterns of mRNA expression and regulation. *Biochem Cell Biol* **80**: 421-426, 2002
- 12) Zhang Q, Gu J, Li L, et al: Control of cyclin D1 and breast tumorigenesis by the EglN2 prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* **16**: 413-424, 2009
- 13) Schlisio S, Kenchappa RS, Vredeveld LC, et al: The kinesin KIF1Bbeta acts downstream from EglN3 to induce apoptosis and is a potential 1p36 tumor suppressor. *Genes Dev* **22**: 884-893, 2008
- 14) Yap DYH, McMahon LP, Hao CM, et al: APSN HIF-PHI Recommendation Committee: Recommendations by the Asian Pacific society of nephrology (APSN) on the appropriate use of HIF-PH inhibitors. *Nephrology (Carlton)* **26**: 105-118, 2021
- 15) Yao B, Wei Y, Zhang S, et al: Revealing a mutant-induced receptor allosteric mechanism for the thyroid hormone resistance. *iScience* **20**: 489-496, 2019

*

*

*