

特集：ストレス応答分子：分子メカニズムの解明と病態の理解

低酸素ストレスと HIF

小林 稔^{1,2}, 原田 浩^{1,2}

酸素は多くの生物にとって生命の維持に必須の分子である。酸素供給が滞った組織内の細胞は、低酸素誘導性因子 (hypoxia-inducible factor: HIF) の活性化を介して様々な遺伝子の発現を誘導し、環境への適応を図る。近年、HIF が低酸素適応応答のみならず、幹細胞の維持や炎症の制御などの恒常性維持機構、さらには虚血性疾患やがんの悪性形質 (がんの転移・浸潤, 治療抵抗性など) に関与していることが明らかとなってきた。HIF を中心とする低酸素バイオロジーは大きな関心を集めている。本稿では、HIF の中でも最も解析が進んでいる HIF-1 を中心に、その活性制御機構や機能、疾病との関わりについて最新の知見も交えて紹介する。

1. はじめに

生命は、細胞内にミトコンドリアを取り込むことで、酸素を活用して効率よく ATP を産生する術を身に付け、進化を加速してきた。今日、我々ヒトを含むほぼすべての多細胞生物は、酸素を失えば生命を維持できない。しかし、生体は高所などの環境要因や、疾病や創傷などによって、一過性、慢性的な低酸素状態に陥ることがある。また生体内の酸素分圧は多様で、局所的ではあるものの低酸素状態を保っている場所も存在する。こういった低酸素ストレスに対する細胞の適応応答で中心的な役割を果たす転写因子が低酸素誘導性因子 (hypoxia-inducible factor: HIF) である。本稿では、HIF による低酸素適応機構に加え、HIF による生体の恒常性維持機構、HIF と疾病との関わりなど、最新の知見も含めて概説する。

2. HIF について

(1) 発見

HIF-1 は、肝がん細胞株 Hep3B において「低酸素依存的にエリスロポエチン (EPO) を誘導する因子」として 1992 年に Semenza らによって発見された¹⁾。そして 1995 年に HIF-1 が HIF-1 α と HIF-1 β のヘテロダイマーであることが報告され、同年に各遺伝子がクローニングされた^{2,3)}。その後、相次いで HIF-2 α や HIF-3 α が同定された^{4,5)}。

(2) HIF について

これら HIFs はそれぞれ特徴的な一次構造をしている (図 1a)。3 種の HIF- α サブユニット、および HIF-1 β サブユニットは、N 末端側に DNA との結合に関わる basic helix-loop-helix (bHLH) 領域と Per-ARNT-Sim homology (PAS) 領域を持つ bHLH/PAS ファミリーに属する転写因子である。HIF- α サブユニットのうち、HIF-1 α と HIF-2 α は、C 末端側に転写活性化に関わる N-terminal trans-activation domain (N-TAD), C-terminal transactivation domain (C-TAD) を、HIF-1 はさらに転写活性を調節する inhibitory domain (ID) を持っている。一方、HIF-3 α はこれらの構成要素のうち C-TAD を、HIF-3 α のスプライシングバリエーションである IPAS は C 末端側そのものを欠いており、HIF-1 α や HIF-2 α と競合することで、その転写活性を抑制することが明らかとなっている^{6,7)}。各 HIF- α サブユニットには oxygen-dependent degradation (ODD) ドメインと呼ばれる

¹ 京都大学生命科学系キャリアパス形成ユニット放射線腫瘍生物学

² 京都大学大学院医学研究科放射線腫瘍学・画像応用治療学 (〒606-8501 京都府京都市左京区吉田近衛町)

Hypoxic stress and HIF

Minoru Kobayashi^{1,2} and Hiroshi Harada^{1,2} (¹Group of Radiation and Tumor Biology, Career-Path Promotion Unit for Young Life Scientists, Kyoto University, ²Department of Radiation Oncology and Image-applied Therapy, Kyoto University Graduate School of Medicine, Yoshida Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan)

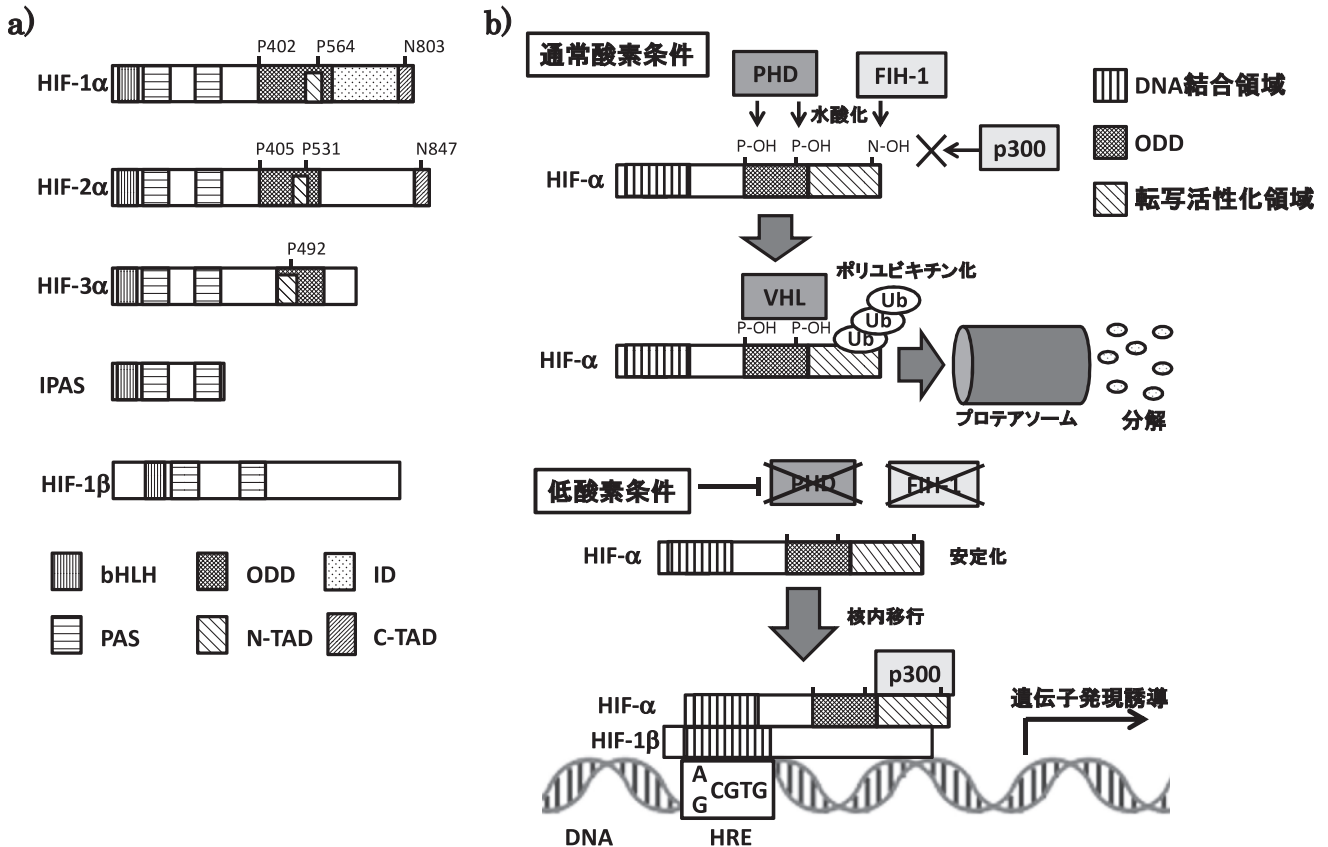


図1 HIFの構造と酸素依存的調節機構

a) 各種HIFの構造. b) 酸素依存的HIF機能制御メカニズム.

領域が存在し、タンパク質の安定性制御を担っている(図1b). この領域に含まれる二つのプロリン残基が、酸素や Fe^{2+} 、 α -ケトグルタル酸、アスコルビン酸を補因子として要求する prolyl hydroxylases (PHD) により水酸化される. この水酸化されたプロリン残基が von Hippel-Lindau タンパク質 (pVHL) を含む E3 ユビキチンリガーゼによってユビキチン化されることにより、HIF- α タンパク質がプロテアソーム依存的に速やかに分解される. その結果、HIF- α サブユニットの細胞内存在量は著しく低下する. 逆に低酸素条件では PHD の活性が低下するため、HIF- α サブユニットは安定化する. そして核内に移行して HIF-1 β サブユニットとヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子上流に存在する hypoxia-response element (HRE: 5'-R (A/G)CGTG-3') に結合する. さらに C-TAD 領域がヒストンアセチル基転移酵素 CREB-binding protein (CBP)/p300 をリクルートすることで遺伝子発現を転写レベルで誘導する. 通常酸素条件下では、PHD と同様にその活性に酸素を要求するアスパラギン水酸化酵素 factor inhibiting HIF-1 (FIH-1) によって C 末端付近にあるアスパラギン残基が水酸化され、結果 CBP/p300 と HIF- α との結合阻害を介して転写活性が抑制される(図1b). 以上のように、PHD や FIH-1 の酸素

要求性に依存したメカニズムによって、HIF- α タンパク質は恒常的に生合成されているにもかかわらず、通常酸素条件下では HIF の転写活性は非常に低く抑えられている.

その他、細胞内で発生した reactive oxygen species (ROS) によって Fe^{2+} が Fe^{3+} に酸化されるため、PHD の機能が阻害され、HIF- α タンパク質が安定化するメカニズムも報告されている⁹⁾. また、mammalian target of rapamycin (mTOR) の活性化による HIF-1 α の翻訳効率の上昇や、細胞内 Ca^{2+} による制御など、様々な酸素濃度非依存的な HIF 活性の調節機構も明らかとなっている⁹⁾.

3. HIF の 機 能

(1) 低酸素適応応答機構

低酸素ストレス応答を司る HIF は 800 個以上の遺伝子発現を調節する¹⁰⁾. 本節では、最も解析の進んでいる HIF-1 に焦点を当て、その機能を概説する.

① 代謝リプログラミング

通常酸素条件にある細胞は、解糖系とミトコンドリアが担う酸化的リン酸化によって1分子のグルコースから38分子のATPを産生する. 一方、低酸素環境では効率よくATPを産生することはできないながらも、嫌氣的解糖系

によって1分子のグルコースから2分子のATPを産生することができる。低酸素環境にさらされた細胞はHIF-1を活性化することで嫌氣的解糖系を亢進し、ATP産生を補償することが明らかになっている(図2a)。例えばHIF-1による解糖系の活性化機構としては、glucose transporter 1 (GLUT1)の発現誘導によってグルコースの取り込みを上昇させることが知られている。また、ピルビン酸を乳酸に変換するlactate dehydrogenase A (LDHA)等、一連の解糖系関連酵素群の発現を上昇させる機能も持つ⁹⁾。

一方、以下のようなメカニズムを通して、HIF-1がミトコンドリアによる酸化的リン酸化反応を抑制することも知られている(図2b)。まず、HIF-1がpyruvate dehydrogenase (PDH) kinase 1 (PDK1)の発現を誘導することでPDHの活性が抑制され、ピルビン酸からアセチルCoAへの変換が阻害される。基質であるアセチルCoAの供給が滞ることによってクエン酸回路が停滞し、ミトコンドリアの機能が抑制される¹¹⁾。HIF-1によってミトコンドリアが積極的に除去される仕組みも明らかになっている。HIF-1によって誘導されるB-cell lymphoma 2 (BCL2)/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 (BNIP3)がBCL2と競合することによって、オートファゴソームの形成に関わるBeclin1を解放する。BNIP3はmTOR経路の活性化に重要なRas homolog enriched in brain (Rheb)と結合し、阻害することによって、オートファジーを促進させる。結果として、

mitophagy (ミトコンドリアのオートファジー)が引き起こされ、機能不全を起こしたミトコンドリアが除去される¹²⁾。

ATP産生を維持する機構とともに、ATPの消費を抑制することによって低酸素環境に適応するメカニズムも報告されている。HIF-1によって発現誘導されたregulated in development and DNA damage response 1 (REDD1)は、mTORの抑制因子であるtuberous sclerosis protein 2 (TSC2)と、14-3-3タンパク質の結合を阻害する。遊離したTSC2がmTOR経路を抑制し、遺伝子の翻訳効率を低下させることによってATPの消費を抑制する¹³⁾。

② ROS 発生の抑制

ミトコンドリアにおいて、酸素は電子伝達系の最終的な電子の受け取り手として働く。低酸素環境下で受け取り手を失った電子によってROSが産生され、細胞の傷害が引き起こされる。HIF-1によって発現が誘導される一連の酵素が機能して、ROSの発生が抑制されることが報告されている(図2b)。HIF-1下流遺伝子のNADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4-like 2 (NDUFA4L2)は、呼吸鎖複合体IのNADH脱水素酵素を抑制し、ミトコンドリア電子伝達系の機能を低下させて、ROSの産生を抑制する¹⁴⁾。またHIFは、電子伝達系に入った電子を酸素に受け渡す複合体IVのcytochrome c oxidase (COX)サブユニット4において、低酸素用のCOX4-2を誘導する。同時

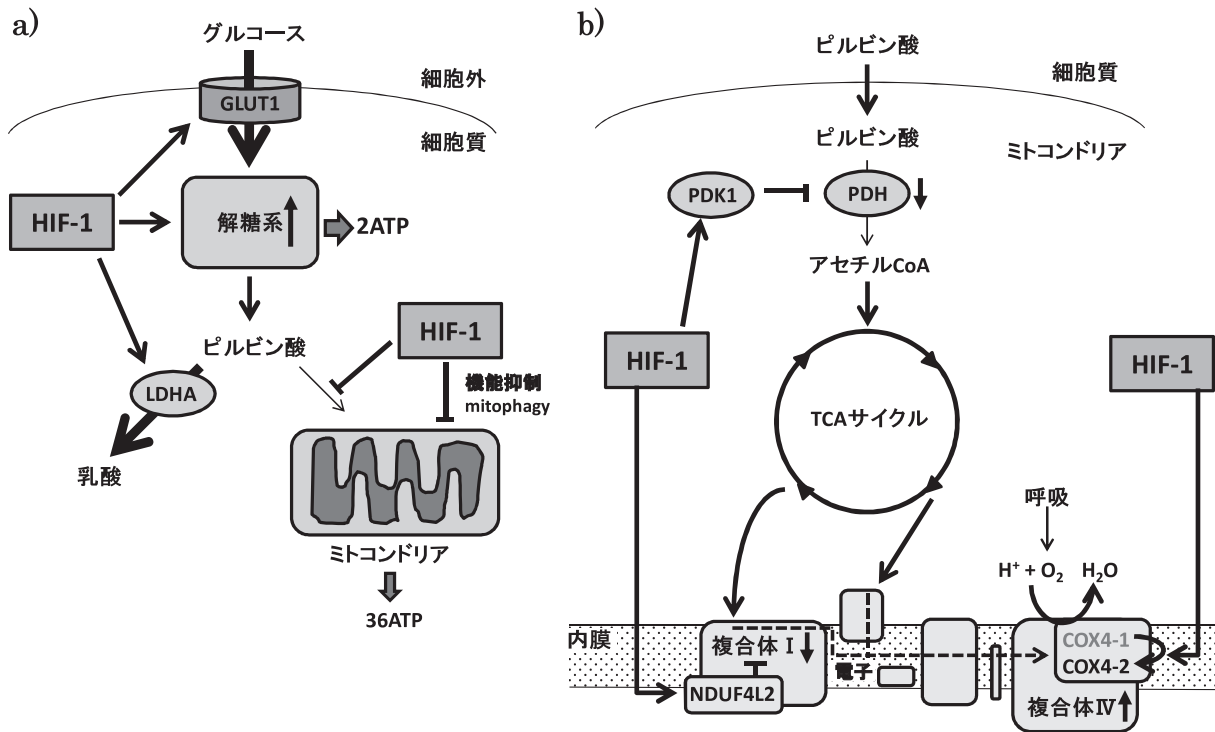


図2 HIFによるエネルギー産生制御
 a) HIF-1による代謝リプログラミング. b) HIF-1によるミトコンドリア機能制御.

にミトコンドリアプロテアーゼ LON を誘導して COX4-1 を分解することで、COX4-1 から 4-2 へと構成因子を切り替える。この COX4-1 から COX4-2 への変換は、低酸素において電子の受け渡しを促進し、低酸素下のミトコンドリア代謝を維持し ROS を抑制し、ATP 産生を増加させる¹⁵⁾。

③ 細胞内 pH 調整

低酸素条件下で解糖系が亢進した結果、最終産物である乳酸が大量に細胞内に蓄積し、細胞内の pH が低下する。これを防ぐために、細胞は monocarboxylate transporter 4 (MCT4) を HIF-1 依存的に発現誘導し、細胞内の乳酸を細胞外に排出する。また、低酸素において誘導される carbonic anhydrase9 (CA9) が細胞外の CO₂ を水和し、H⁺ と HCO₃⁻ に変換する。このうち HCO₃⁻ が細胞内に取り込まれることによって細胞内 pH をアルカリ側に傾け、細胞内 pH の調節がなされる¹⁶⁾。

④ 個体、組織レベルにおける酸素供給量制御

HIF は、ここまで説明してきた細胞レベルの制御のみでなく、個体、組織レベルにおいても低酸素適応応答に重要な役割を担っている。HIF-1 発見の契機となった EPO は造血を誘導し、赤血球を増加させることで血中の酸素運搬量を増加させる。また、HIF は血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) や platelet-derived growth factor beta polypeptide (PDGFB)、さらに basic fibroblast growth factor (bFGF) などの発現を誘導し、血管形成を亢進、そして最終的に酸素環境を改善する作用も持つ¹⁷⁾。

(2) 発生・幹細胞制御

① 個体発生

哺乳類の個体発生時、胎児は成人の生体内よりも低い酸素分圧にさらされている。ノックアウト (KO) マウスを用いた研究から、この低酸素が HIF を介して個体形成に重要であることが明らかとなっている。例えば、HIF-1 α KO マウスは、心臓の奇形や赤血球形成など、循環器系に異常をきたし、胎生 10.5 日で死亡する¹⁸⁾。また、HIF-2 α KO マウスも、系統による違いはあるものの、血管形成や肺形成などで異常が見られる¹⁹⁾。

② 造血幹細胞

幹細胞形質の維持や分化の制御などにおいても HIF が重要な役割を担っていることが近年明らかとなりつつある。造血幹細胞は、骨髄膜に存在する骨髄の低酸素ニッチに局在しており、低酸素状態の細胞を選択的に殺傷するチラパザミンの投与によって造血幹細胞が失われることが報告されている²⁰⁾。実際、骨髄細胞を低酸素で培養した場合、コロニー形成能や移植効率など、幹細胞形質が上昇すること、さらに、長期造血幹細胞 (long-term hematopoietic stem cells : LT-HSC) は、HIF-1 の mRNA やタンパク質量が多いこと、HIF-1 α コンディショナル KO マウスの造血幹細胞は、骨髄再構築能が低下していることなどが報告さ

れている²¹⁾。

LT-HSC は通常、多くが細胞周期静止期 (G₀ 期) にあり、薬剤排出能が高く、抗がん剤抵抗性を示す side population (SP) 画分に存在している。しかし、HIF-1 α を欠損した LT-HSC は、細胞周期は G₀ 期から増殖期に入り、抗がん剤 5-FU や老化のストレスに対する抵抗性が低下する。その一方で、VHL の欠損により HIF-1 が大量に存在する場合、通常多くが増殖期にある造血前駆細胞において、G₀ 期の細胞の割合が増加し、骨髄再構築能が失われる。このように、低酸素を介した造血幹細胞の維持には HIF-1 量の厳密な調節が重要である²²⁾。この他にも、造血幹細胞のニッチである骨内膜細胞が HIF-1 依存的に ES 細胞の分化や発がんに関わることが知られる Cripto を産生し、造血幹細胞表面に局在する glucose-regulated protein 78 (GRP78) を刺激することで Akt と HIF-1 を順次活性化し、造血幹細胞を維持することが報告されている²³⁾ (図 3)。

③ その他の幹細胞

HIF-1 が、胚の初期発生や、海馬における Wnt/ β -catenin シグナル経路を介した神経幹細胞の維持や増殖、分化へ関与することも報告されている。その他にも、コンディショナル KO を用いた実験系より、軟骨や脂肪など様々な細胞の発生に関係することも明らかとなっている^{19,24,25)}。

(3) 炎症

近年、細胞の低酸素応答と炎症とが非常に密接な関係にあることが明らかとなっている²⁶⁾。例えば生体が高山病などの低酸素ストレスにさらされた際、炎症性サイトカイン interleukin (IL)-6 や、炎症マーカー C-reactive protein (CRP) の血中濃度が増加することが明らかとなっている。また、炎症部位では、免疫細胞などの浸潤や、代謝の亢進などによって、栄養や酸素が消費されてしまうため、低酸素状態が引き起こされる。本節では、低酸素が炎症を引き起こす仕組みや、HIF による免疫細胞の制御についての知見をまとめる。

① 低酸素と炎症細胞

HIF は好中球やマクロファージ (M Φ) などによる炎症反応において重要な役割を担っていることが報告されている。HIF-1 は好中球の代謝リプログラミングやアポトーシス抵抗性を誘導して、低酸素の炎症部位での活動を可能にする。さらに HIF-1 は、病原体の構成物質を認識して免疫反応を始動させる toll-like receptor 4 (TLR4) や、様々な炎症性サイトカインやケモカインの発現を誘導すること、また、HIF-2 α の欠失によって M Φ の運動性や浸潤能が低下することなどが知られている^{27~29)}。

低酸素による炎症においては、炎症反応に深く関わりのある転写因子の一つ、nuclear factor-kappaB (NF- κ B) も重要である (図 4a)。NF- κ B は通常、inhibitor of NF- κ B (I κ B) と結合することにより、機能が抑制されている。I κ B は活

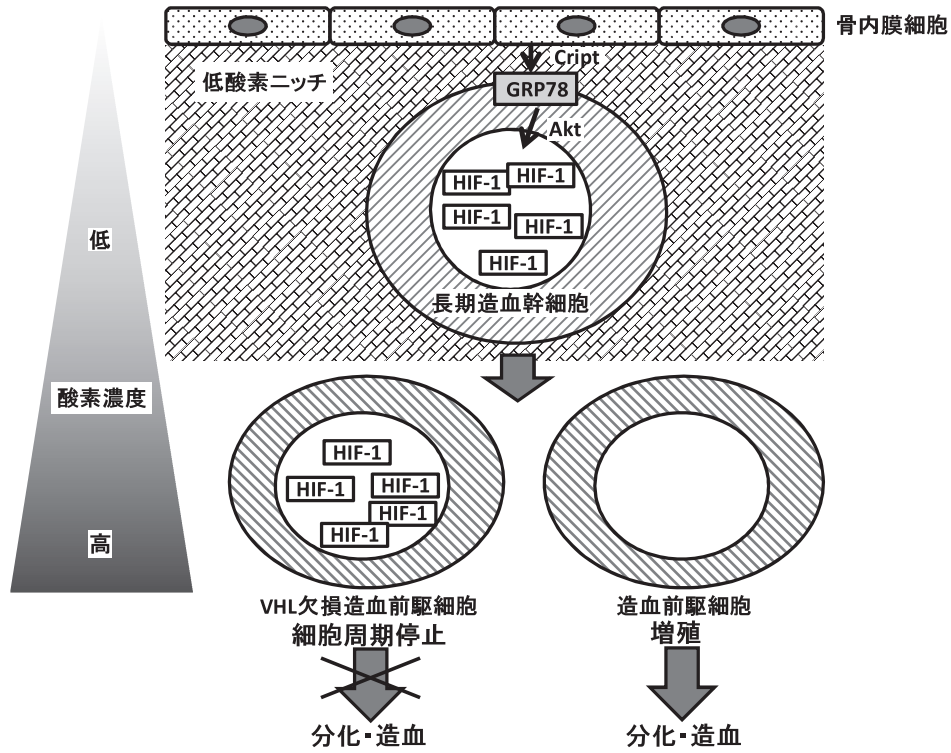


図3 HIF-1による造血幹細胞制御

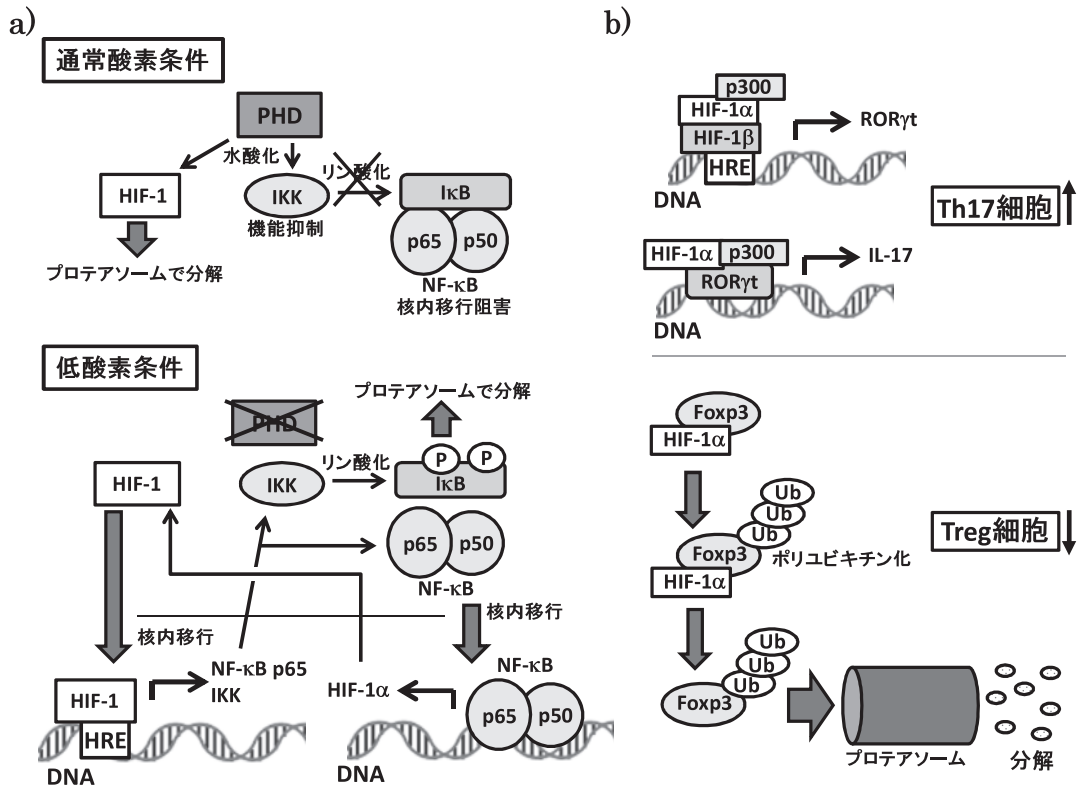


図4 HIFと炎症

a) HIF-1とNF-κBの相互活性化機構. b) HIF-1αによるTh17細胞/Treg細胞バランス制御.

性化した I kappa B kinase (IKK)によってリン酸化を受け、プロテアソームで分解を受ける。これによって NF- κ B が I κ B から解放され、核移行が起こり、下流遺伝子の発現が誘導される。通常酸素条件下では IKK の活性は PHD により水酸化を受け抑制されている。したがって、低酸素では IKK の活性が上昇し、結果として NF- κ B の活性が上昇する³⁰⁾。これに加えて、NF- κ B は HIF-1 の発現を誘導し、HIF-1 は NF- κ B p65 や IKK を誘導することから、低酸素応答と炎症反応はポジティブフィードバックループを引き起こすと推定されている³¹⁾。

② HIF と免疫応答

免疫系の調節に重要な役割を担っているヘルパー T (Th) 細胞は、産生するサイトカインの違いから、interferon (IFN)- γ などを産生しウイルス排除など細胞性免疫を司る Th1 細胞、IL-4などを産生し寄生虫排除など液性免疫を司る Th2 細胞、さらに IL-17 を産生する Th17 細胞や免疫系を抑制する regulatory T (Treg) 細胞などに分類される³²⁾。これら Th 細胞のうち、Th17 細胞分化の主要調節因子である RAR-related orphan receptor (ROR) γ t が、HIF-1 α と協調することで IL-17 の産生を引き起こすことが示唆されている。一方、Th17 細胞誘導条件下では、ユビキチン化された HIF-1 α が Treg 細胞分化の主要調節因子である Foxp3 と結合し、プロテアソームで Foxp3 とともに分解されることが明らかとなっている。これらの結果から、HIF-1 α が Th17 細胞と Treg 細胞のバランスを調節していることが示唆されている³³⁾(図 4b)。その他、M Φ において、Th1 サイトカインである IFN- γ と Th2 サイトカインの IL-4 がそれぞれ HIF-1 α 、HIF-2 α を誘導、inducible nitric oxide (NO) synthase (iNOS) とアルギナーゼの発現レベルを調節することによって NO レベルのバランスが制御されていることが知られている³⁴⁾。

(4) その他

これらの他にも、HIF は、miR210 をはじめとするいくつかの micro RNA の発現を誘導することによって間接的に様々な遺伝子の発現を調節する³⁵⁾。さらに、HIF そのものが他のタンパク質と複合体を作ることで転写活性化や分解など、標的タンパク質の機能を調節することなども知られている³⁶⁾。

4. HIF と疾病

前節で述べたように、HIF は生体において低酸素適応応答のみでなく様々な生理現象の調節に関わっている。このことから、HIF は様々な疾患治療のターゲットとして有望であることが予測されている。

(1) 虚血性疾患

心筋梗塞や脳梗塞をはじめとする虚血性疾患では、血流が失われることにより患部が低酸素環境に陥り、障害が引

き起こされる。これらの疾患においては、HIF による低酸素適応応答が保護的に働くことが知られている。マウスを対象とした虚血再還流モデルで、短時間の虚血処理(虚血プレコンディショニング)を行うことで、その後の致命的な虚血に対する抵抗性を獲得することが確認されている。Hif1 α ^{+/-}マウスではこの虚血プレコンディショニングの効果が失われることから、HIF-1 が機能していることが示唆されている³⁷⁾。また、HIF-1 の活性化につながる PHD 阻害剤を投与することで、様々な組織の虚血性壊死が軽減されるといった研究結果も報告されており³⁸⁾、実臨床において虚血性疾患の予後の改善に寄与することが期待されている。

(2) がん

固形がんの組織では、がん細胞が非常に早い速度で増殖するのに対して、腫瘍内部の血管形成速度は遅い。また、腫瘍血管は極めて脆弱で蛇行しており、頻りに閉塞や血液の逆流を引き起こす。その結果、腫瘍組織には十分な酸素が供給されない低酸素領域が生じ、HIF が活性化することが知られている³⁹⁾。さらに、腎明細胞がんにおける VHL の欠失や、多くのがんで見られる phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt 経路の活性化など、低酸素とは無関係に HIF が活性化していることが多々ある⁴⁰⁾。HIF の発現量と予後不良に正の相関が見られていることから、HIF はがん研究においてとりわけ大きな注目を集めている。この節では、がん細胞における HIF の機能などについてまとめる。

① HIF によるがん細胞の環境適応

HIF はがん細胞においても通常の細胞と同様に、代謝リプログラミングや血管新生を介して低酸素に対する適応に寄与している⁴¹⁾。特に、がん細胞は通常酸素条件下でも解糖系を用いて ATP を産生しており (Warburg 効果)、これに HIF-1 が深く関わっていることが多くの研究から明らかになりつつある。

さらに、がん組織は十分な血流が得られないため、低酸素に加えて低栄養状態にある。がん細胞は HIF を介した自身の低酸素、低栄養環境への適応のみならず、がん組織を構築する細胞を変化させ、この、低酸素、低栄養状態に適応している。例えば、がん組織では、腫瘍が産生する ROS によって、がん関連繊維芽細胞 (cancer associated fibroblast: CAF) の HIF-1 を活性化、代謝リプログラミングを誘発させ、乳酸を産生させる。この CAF や低酸素領域のがん細胞から産生される乳酸が、血管近傍の酸素濃度が比較的高い領域に存在するがん細胞の MCT1 から取り込まれる。この取り込まれた乳酸が、ミトコンドリアの酸化リン酸化に使用されることにより、グルコースの消費が抑えられ、血管から離れた領域の細胞までグルコースが行き渡り、栄養状態が改善されることが示唆されている^{42,43)}。

② 低酸素と転移

近年がんの転移と HIF の関係が明らかになってきている (図 5a)。転移は多くのステップから成り立っており、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition : EMT) は特に重要な要素である。HIF は、がん細胞において EMT を制御する転写因子 TWIST の発現を誘導し、また VEGF を介して EMT 制御因子 SNAIL の核内移行を引き起こす。さらに、HIF は transforming growth factor (TGF)- β と協調して Sma and Mad Related Family (SMAD) 経路を活性化するなど、様々な経路を介して E-cadherin の低下をはじめとする EMT を引き起こす⁴⁴⁾。加えて、乳がんでは、HIF-1 によって誘導される angiopoietin-related protein 4 (ANGPTL4) が血管内皮細胞間の接着を障害し、がんの血管外遊走を促進すること、さらに HIF-1 によって、がん細胞から lysyl oxidase (LOX) や LOX 様タンパクが産生され、原発巣の細胞外マトリクスをリモデリングし、がん細胞の浸潤を促進することも報告されている。また原発腫瘍から分泌されて血流にのった LOX が肺のコラーゲンを架橋し、CD11b 陽性骨髄由来細胞をリクルートすることでがん細胞生着に

適したニッチ (pre-metastatic niche) が形成され、転移を誘発することが明らかとなっている⁴⁵⁾ (図 5a)。

③ HIF と治療抵抗性

低酸素や HIF は様々な治療に対する抵抗性とも関係があることが知られている。例えば、HIF-1 が活性化することによって、薬剤の細胞外排出に関わる multi drug resistant protein 1 (MDR1) の発現が誘導されることや⁴⁶⁾、細胞周期が p27^{Kip1} 依存的に静止期に留まることで細胞増殖依存的な薬剤に対する抵抗性を獲得することなどが知られている⁴⁷⁾。

低酸素状態では化学的な要素 (酸素効果) や HIF を介した VEGF の効果などで放射線への抵抗性が増強することはよく知られている⁴⁸⁾。さらに近年我々は、低酸素、低グルコースの環境に存在していたがん細胞が放射線治療を有意に生き残り、その後 HIF-1 活性を獲得して腫瘍血管へ向けて遊走し、最終的にがんの再発を導くというがんの再発機構を明らかにした^{49,50)} (図 5b)。

④ その他 (がんに関して)

このように、がんと低酸素、HIF は密接に関わってお

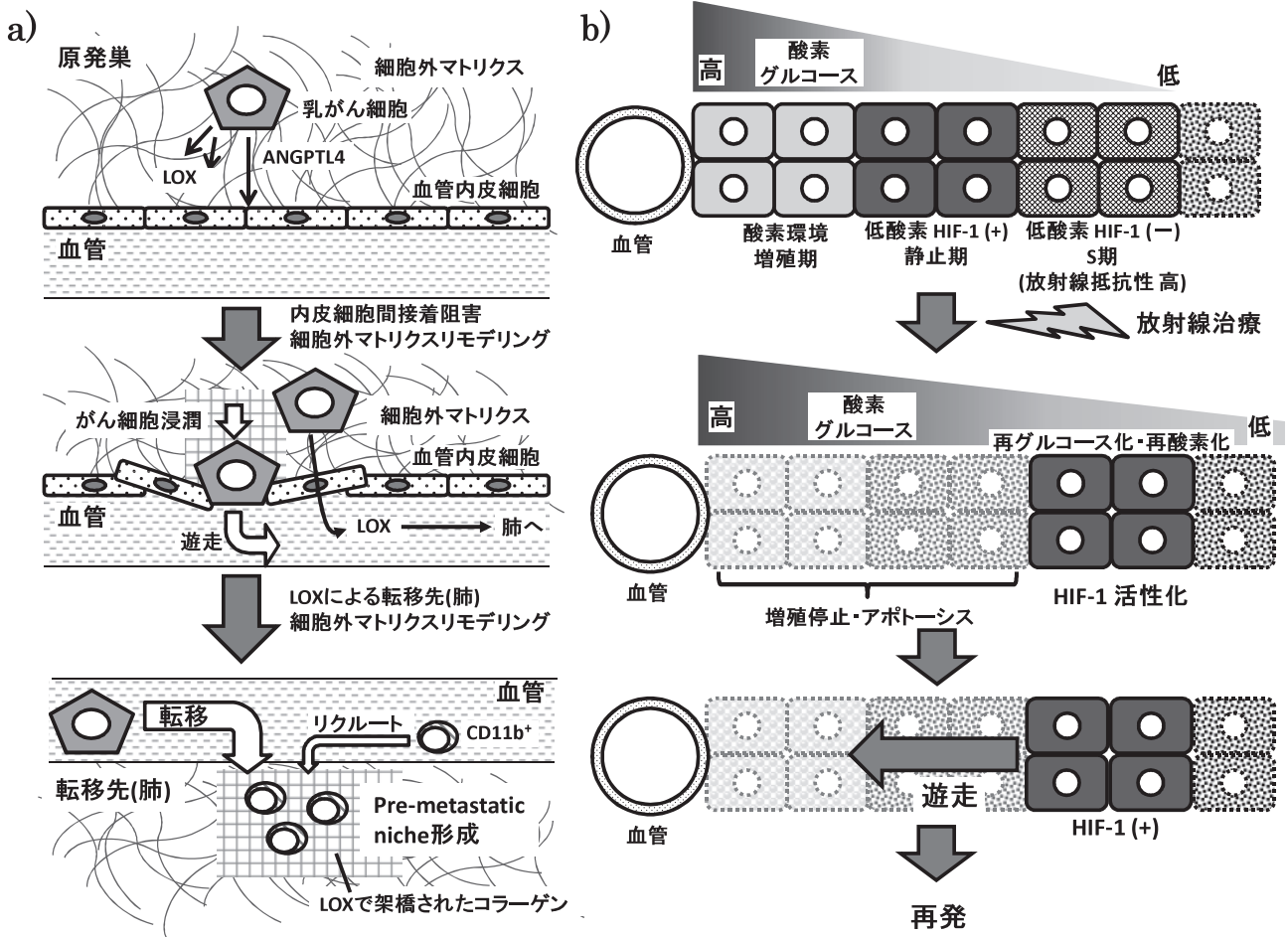


図 5 HIF とがん細胞の悪性形質
a) 乳がん細胞の肺転移. b) 放射線治療後の再発における HIF の関与.

り、HIF はがん治療のターゲットとして非常に有望視されている。しかし、HIF は時に腫瘍増殖に対して抑制的に働くといった報告もあることなどから、状況に合わせた治療法の確立が必要であると考えられる。

5. おわりに

本稿では、HIF-1 を中心とした生体制御機構や疾病との関わりを概説した。しかし、低酸素応答に関わる因子は HIF-1 だけでなく、HIF-2 や HIF-3 に加えて、他にも様々な因子が存在し、それらが複雑に関係しあっていることが明らかとなりつつある。しかし、いまだ低酸素ストレス応答の全容は明らかとなっておらず、一層の研究が必要である。

文 献

- 1) Semenza, G.L. & Wang, G.L. (1992) *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 5447-5454.
- 2) Wang, G.L. & Semenza, G.L. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 1230-1237.
- 3) Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., & Semenza, G.L. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5510-5514.
- 4) Hara, S., Hamada, J., Kobayashi, C., Kondo, Y., & Imura, N. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **287**, 808-813.
- 5) Tian, H., McKnight, S.L., & Russell, D.W. (1997) *Genes Dev.*, **11**, 72-82.
- 6) Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A., & Poellinger, L. (2001) *Nature*, **414**, 550-554.
- 7) Makino, Y., Kanopka, A., Wilson, W.J., Tanaka, H., & Poellinger, L. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 32405-32408.
- 8) Klimova, T. & Chandel, N.S. (2008) *Cell Death Differ.*, **15**, 660-666.
- 9) Majmundar, A.J., Wong, W.J., & Simon, M.C. (2010) *Mol. Cell*, **40**, 294-309.
- 10) Schödel, J., Oikonomopoulos, S., Ragoussis, J., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., & Mole, D.R. (2011) *Blood*, **117**, e207-e217.
- 11) Kim, J.W., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., & Dang, C.V. (2006) *Cell Metab.*, **3**, 177-185.
- 12) Li, Y., Wang, Y., Kim, E., Beemiller, P., Wang, C.Y., Swanson, J., You, M., & Guan, K.L. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 35803-35813.
- 13) Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R.L., Manning, B.D., Reiling, J. H., Hafen, E., Witters, L.A., Ellisen, L.W., & Kaelin, W.G. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 2893-2904.
- 14) Tello, D., Balsa, E., Acosta-Iborra, B., Fuertes-Yebra, E., Elorza, A., Ordóñez, Á., Corral-Escariz, M., Soro, I., López-Bernardo, E., Perales-Clemente, E., Martínez-Ruiz, A., Enríquez, J.A., Aragonés, J., Cadenas, S., & Landázuri, M.O. (2011) *Cell Metab.*, **14**, 768-779.
- 15) Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J.W., Shimoda, L., Dang, C.V., & Semenza, G.L. (2007) *Cell*, **129**, 111-122.
- 16) Rademakers, S.E., Lok, J., van der Kogel, A.J., Bussink, J., & Kaanders, J.H. (2011) *BMC Cancer*, **11**, 167.
- 17) Rey, S. & Semenza, G.L. (2010) *Cardiovasc. Res.*, **86**, 236-242.
- 18) Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y., & Semenza, G.L. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 149-162.
- 19) Semenza, G.L. (2012) *Cell*, **148**, 399-408.
- 20) Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, J.A., Sackstein, R., & Down, J.D. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5431-5436.
- 21) Suda, T., Takubo, K., & Semenza, G.L. (2011) *Cell Stem Cell*, **9**, 298-310.
- 22) Takubo, K., Goda, N., Yamada, W., Iriuchishima, H., Ikeda, E., Kubota, Y., Shima, H., Johnson, R.S., Hirao, A., Suematsu, M., & Suda, T. (2010) *Cell Stem Cell*, **7**, 391-402.
- 23) Miharada, K., Karlsson, G., Rehn, M., Rörby, E., Siva, K., Cammenga, J., & Karlsson, S. (2012) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1266**, 55-62.
- 24) Mazumdar, J., O'Brien, W.T., Johnson, R.S., LaManna, J.C., Chavez, J.C., Klein, P.S., & Simon, M.C. (2010) *Nat. Cell Biol.*, **12**, 1007-1013.
- 25) Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., Deberardinis, R.J., Mahmoud, A.I., Olson, E.N., Schneider, J.W., Zhang, C.C., & Sadek, H.A. (2010) *Cell Stem Cell*, **7**, 380-390.
- 26) Eltzschig, H.K. & Carmeliet, P. (2011) *N. Engl. J. Med.*, **364**, 656-665.
- 27) Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B.E., Förster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., Haase, V.H., Jaenisch, R., Corr, M., Nizet, V., Firestein, G.S., Gerber, H.P., Ferrara, N., & Johnson, R.S. (2003) *Cell*, **112**, 645-657.
- 28) Peyssonnaud, C., Cejudo-Martin, P., Doedens, A., Zinkernagel, A.S., Johnson, R.S., & Nizet, V. (2007) *J. Immunol.*, **178**, 7516-7519.
- 29) Imtiyaz, H.Z., Williams, E.P., Hickey, M.M., Patel, S.A., Durham, A.C., Yuan, L.J., Hammond, R., Gimotty, P.A., Keith, B., & Simon, M.C. (2010) *J. Clin. Invest.*, **120**, 2699-2714.
- 30) Cummins, E.P., Berra, E., Comerford, K.M., Ginouves, A., Fitzgerald, K.T., Seeballuck, F., Godson, C., Nielsen, J.E., Moynagh, P., Pouyssegur, J., & Taylor, C.T. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 18154-18159.
- 31) Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A.S., Nizet, V., Johnson, R.S., Haddad, G.G., & Karin, M. (2008) *Nature*, **453**, 807-811.
- 32) Romagnani, S. (2006) *Clin. Exp. Allergy*, **36**, 1357-1366.
- 33) Dang, E.V., Barbi, J., Yang, H.Y., Jinasena, D., Yu, H., Zheng, Y., Bordman, Z., Fu, J., Kim, Y., Yen, H.R., Luo, W., Zeller, K., Shimoda, L., Topalian, S.L., Semenza, G.L., Dang, C.V., Pardoll, D.M., & Pan, F. (2011) *Cell*, **146**, 772-784.
- 34) Takeda, N., O'Dea, E.L., Doedens, A., Kim, J.W., Weidemann, A., Stockmann, C., Asagiri, M., Simon, M.C., Hoffmann, A., & Johnson, R.S. (2010) *Genes Dev.*, **24**, 491-501.
- 35) Chan, Y.C., Banerjee, J., Choi, S.Y., & Sen, C.K. (2012) *Microcirculation*, **19**, 215-223.
- 36) Greer, S.N., Metcalf, J.L., Wang, Y., & Ohh, M. (2012) *EMBO J.*, **31**, 2448-2460.
- 37) Cai, Z., Zhong, H., Bosch-Marce, M., Fox-Talbot, K., Wang, L., Wei, C., Trush, M.A., & Semenza, G.L. (2008) *Cardiovasc. Res.*, **77**, 463-470.
- 38) Fraisl, P., Aragonés, J., & Carmeliet, P. (2009) *Nat. Rev. Drug Discov.*, **8**, 139-152.
- 39) Brown, J.M. & Wilson, W.R. (2004) *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 437-447.
- 40) Semenza, G.L. (2012) *Trends Pharmacol. Sci.*, **33**, 207-214.
- 41) Keith, B. & Simon, M.C. (2007) *Cell*, **129**, 465-472.
- 42) Rattigan, Y.I., Patel, B.B., Ackerstaff, E., Sukenick, G., Koutcher, J.A., Glod, J.W., & Banerjee, D. (2012) *Exp. Cell Res.*, **318**, 326-335.

- 43) Fiaschi, T., Marini, A., Giannoni, E., Taddei, M.L., Gandellini, P., De Donatis, A., Lanciotti, M., Serni, S., Cirri, P., & Chiarugi, P. (2012) *Cancer Res.*, **72**, 5130–5140.
- 44) Jiang, J., Tang, Y.L., & Liang, X.H. (2011) *Cancer Biol. Ther.*, **11**, 714–723.
- 45) Semenza, G.L. (2012) *Trends Mol. Med.*, **18**, 534–543.
- 46) Ji, Z., Long, H., Hu, Y., Qiu, X., Chen, X., Li, Z., Fan, D., Ma, B., & Fan, Q. (2010) *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **29**, 158.
- 47) Gardner, L.B., Li, Q., Park, M.S., Flanagan, W.M., Semenza, G.L., & Dang, C.V. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 7919–7926.
- 48) Harada, H. (2011) *J. Radiat. Res.*, **52**, 545–556.
- 49) Harada, H., Inoue, M., Itasaka, S., Hirota, K., Morinibu, A., Shinomiya, K., Zeng, L., Ou, G., Zhu, Y., Yoshimura, M., McKenna, W.G., Muschel, R.J., & Hiraoka, M. (2012) *Nat. Commun.*, **3**, 783.
- 50) Zhu, Y., Zhao, T., Itasaka, S., Zeng, L., Yeom, C. J., Hirota, K., Suzuki, K., Morinibu, A., Shinomiya, K., Ou, G., Yoshimura, M., Hiraoka, M., & Harada, H. (2012) *Oncogene*, doi: 10.1038/onc.2012.223.
-