

第 5 回万有医学奨励賞－生活習慣病領域－
研究成果報告書(追加助成) <概要>

所 属	慶應義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝内科
氏 名	林 香
研究テーマ	糖尿病性腎症におけるポドサイトのエピゲノム制御機構の解明と治療への応用

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを 1 ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

【背景・目的】

これまで申請者らは、レニンアンジオテンシン系 (RAS) 抑制薬の高血圧や動脈硬化、慢性腎臓病 (CKD) に対する持続的効果、すなわち「メモリー効果」について検討し報告してきた。CKD の尿蛋白に対して認められた RAS 抑制薬による持続的効果の機序を検討する過程において、我々は尿蛋白バリアにおいて重要である糸球体上皮細胞 (ポドサイト) に発現する転写因子 Kruppel-like Factor 4 (KLF4) に着目し検討を行った。その結果、KLF4 はポドサイト形質制御遺伝子をエピジェネティックな機序を介して遺伝子特異的に調節していることが明らかとなった (Hayashi, et al. *J Clin Invest.* 2014)。更に、RAS 阻害薬による尿蛋白抑制効果に一部 KLF4 を介したエピジェネティックな機序が関与していることを報告し (Hayashi, et al. *Kidney Int.* 2015) Review にも取り上げられた (*Kidney Int.*, 2015)。

しかし何故 CKD においてエピジェネティックな変化が認められるのか、どのような機序で遺伝子特異的な変化がもたらされるのか、未だ不明な点が多い。次に我々は疾患においてこのようなエピゲノム変化が生じるメカニズムについて理解したいと考えた。そこで、エピゲノム変化形成と DNA 損傷修復との関連に注目した。二本鎖 DNA 損傷 (DSB) 修復因子であり、KLF4-interacting protein という報告のあるヒストンアセチル化酵素 KAT5 に注目し、**糖尿病性腎症におけるポドサイトのエピゲノム変化形成プロセスを明らかにすること**を目的とした。

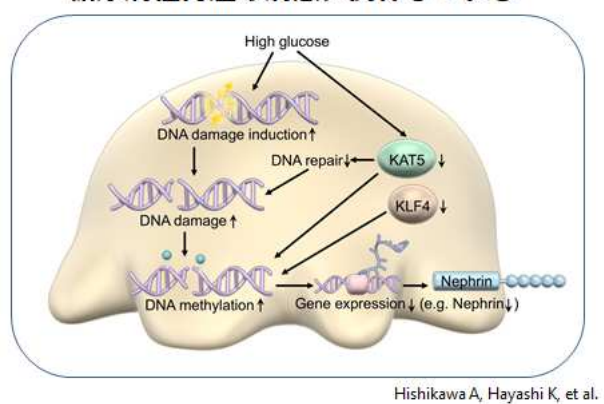
【方法・結果】

ポドサイト特異的 KAT5 ノックアウトマウスを作成したところ、著明な尿蛋白、腎不全となり 6 週齢前後で死亡した。巣状糸球体硬化症 (FSGS) の組織像を呈し、ポドサイト数の減少、ポドサイトアポトーシスの増加、ポドサイト DSB 増加、DNA メチル化増加、ポドサイトマーカーの発現低下を認めた。発生段階での関与を除外するため、タモキシフェン誘導型ポドサイト特異的 KAT5 ノックアウトマウスを作成したが、KAT5 ノックダウン誘導後 4 週から同様の著明な蛋白尿を呈した。これらの結果から、**KAT5 を介した DSB 修復はポドサイト維持に必須である**ことが示唆された。

またヒト検体を用いた大規模データベースを用いて、各種腎炎で糸球体の KAT5 発現の変動を調べたところ、糖尿病性腎症で有意に KAT5 発現が低下しており、腎生検検体を用いて免疫蛍光染色においても、糖尿病性腎症では KAT5 発現が低下していることが示唆された。糖尿病モデルマウス (STZ 誘発性導尿病モデル、db/db マウスモデル) においても同様のポドサイト KAT5 低下を認め、遺伝子導入法により低下した KAT5 を補充することにより尿アルブミンの改善、ポドサイト DSB の改善を認めた。またヒト培養ポドサイトを用いた検討の結果、ポドサイトにおいて重要なスリット膜分子であるネフリンのプロモーター領域の同一部位において、KAT5 発現により DSB 低下を示唆する γ H2AX の低下と DNA メチル化低下が認められたことから、**糖尿病性腎症においては KAT5 低下という DNA 損傷修復環境が DNA メチル化の変化を惹起している可能性が明らかになった** (Hishikawa A, Hayashi K et al. *Cell Rep*, in press, 図 1)。

この成果に基づき、根本的治療法のない糖尿病性腎症において、ポドサイトの KAT5 あるいは DNA 損傷修復環境の是正が、新規治療標的となり得る可能性が期待される。

図 1 ポドサイト KAT5 の低下は糖尿病性腎症の病態に関係している



第 5 回万有医学奨励賞－生活習慣病領域－

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

所 属	慶應義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝内科
氏 名	林 香
研究テーマ	糖尿病性腎症におけるポドサイトのエピゲノム制御機構の解明と治療への応用

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

【背景】これまで申請者らは、レニンアンジオテンシン系(RAS)抑制薬の高血圧や動脈硬化、慢性腎臓病(CKD)に対する持続的効果、すなわち「メモリー効果」について検討し報告してきた(Ishiguro and Hayashi, et al. *Hypertension*. 2009, Hayashi, et al. *Kidney Int*. 2010, Hayashi, et al. *J Atheroscler Thromb*. 2012)。高血圧発症・持続においては、腎細動脈のリモデリングが関与しており、一過性のRAS 阻害が腎細動脈の構造変化として記憶され、持続的に血圧を抑制する現象を報告した。一方 CKD の尿蛋白に対して認められた RAS 抑制薬による持続的効果の機序を検討する過程において、我々は尿蛋白バリアにおいて重要である糸球体上皮細胞(ポドサイト)に発現する転写因子 Kruppel-like Factor 4 (KLF4)に着目し検討を行った。その結果、KLF4 はポドサイト形質制御遺伝子をエピジェネティックな機序を介して遺伝子特異的に調節していることが明らかとなった(Hayashi, et al. *J Clin Invest*. 2014)。更に、RAS 阻害薬による尿蛋白抑制効果に一部 KLF4 を介したエピジェネティックな機序が関与していることを報告した(Hayashi, et al. *Kidney Int*. 2015)。この成果は Review にも取り上げられた(D.Feliers. *Kidney Int*, 2015. 図1)。

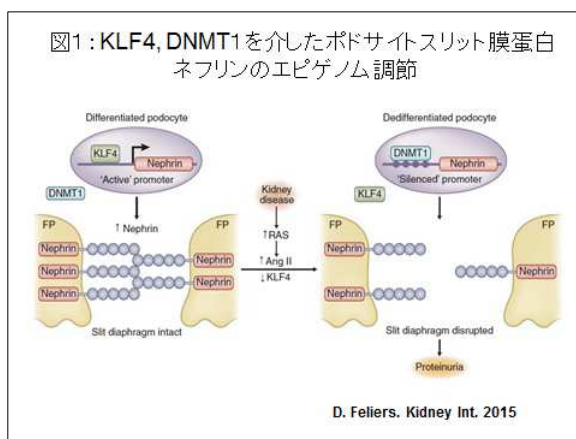
しかし何故 CKD においてエピジェネティックな変化が認められるのか、どのような機序で遺伝子特異的变化がもたらされるのか、未だ不明な点が多い。

【目的】そこで本研究においてはポドサイト遺伝子のエピジェネティックな調節機構に関して更に詳細な機序を検討することを目的とした。

申請者はこれまでの検討の結果から、尿蛋白バリアとして重要なポドサイトスリット膜蛋白であるネフリン遺伝子に着目すると、正常なポドサイトにおいては転写因子 KLF4 発現が保たれており、それに伴ってネフリンプロモーター領域の DNMT1 結合は低下しているが、蛋白尿を呈する CKD においては、アンジオテンシン II をはじめとする傷害因子により KLF4 発現が低下し、ネフリンプロモーター領域の DNMT1 結合の亢進、DNA メチル化の亢進を認めることが示唆された(図 1)。

そこで、DNA メチル化変化と関連のある生理的反応として、DNA 損傷、特に二本鎖 DNA 損傷(DSB)修復に着目した。DNA 修復は細胞の生存に不可欠な機構であるが、塩基対とともにエピゲノム修飾も同時に修復する必要があるため、エピゲノム修飾酵素が多数関与する反応であることが知られている。また老化においては、DNA 損傷修復の繰り返しに起因するエピゲノム修飾エラーが、老化の表現型に関与していることが示唆されているが、その詳細な分子機序は不明である(Nat Rev Mol Cell Biol, 2015)。本研究では、ポドサイトのエピゲノム変化形成に、DNA 修復が関与しているのではないかと考え、DSB において重要な役割を果たし、かつ KLF4-interacting protein と報告のあるヒストンアセチル化酵素 KAT5 に注目して検討を行った。ポドサイトは終末分化細胞であることから、特殊な DNA 修復機構、DNA メチル化維持機構が存在することが予想された。

図1: KLF4, DNMT1を介したポドサイトスリット膜蛋白ネフリンのエピゲノム調節



D. Feliers. *Kidney Int*. 2015

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

【方法・結果】

(1)ポドサイト特異的 KAT5 ノックアウトマウス (Podocin-Cre KAT5 fl/fl) およびタモキシフェン誘導型ポドサイト特異的 KAT5 ノックアウトマウス (Podocin-Cre^{ERT2} KAT5 fl/fl) を用いた検討

KAT5 のポドサイトにおける生理的役割を検討するため、ポドサイト特異的 KAT5 ノックアウトマウスを作成したところ、著明な尿蛋白、腎不全となり 6 週齢前後で死亡した。巣状糸球体硬化症 (FSGS) の組織像を呈し、ポドサイト数の減少、ポドサイトアポトーシスの増加、ポドサイト DSB 増加、DNA メチル化増加、ポドサイトマーカーの発現低下を認めた (図2)。ポドサイトを単離して DNA メチル化に関する DNA メチル化酵素 DNMT1,3A,3B および DNA 脱メチル化酵素 DNMT1 および DNMT3B 発現が亢進していた。

次に発生段階での関与を除外するため、タモキシフェン誘導型ポドサイト特異的 KAT5 ノックアウトマウスを作成したが、KAT5 ノックダウン誘導後 4 週から同様の著明な蛋白尿を呈した (図3)。これらの結果から、**KAT5 を介した DSB 修復はポドサイト維持に必須である**ことが示唆された。

またヒト培養ポドサイトを用いた in vitro の検討により、ポドサイトで KAT5 を 1 週間ノックダウンすると、DSB を示唆する γ H2AX の増加、染色体分析では DNA 損傷を示唆する所見の増加、DNA メチル化亢進を認めた。

(2)ヒト糖尿病性腎症腎生検検体およびマウス糖尿病性腎症モデルを用いた検討

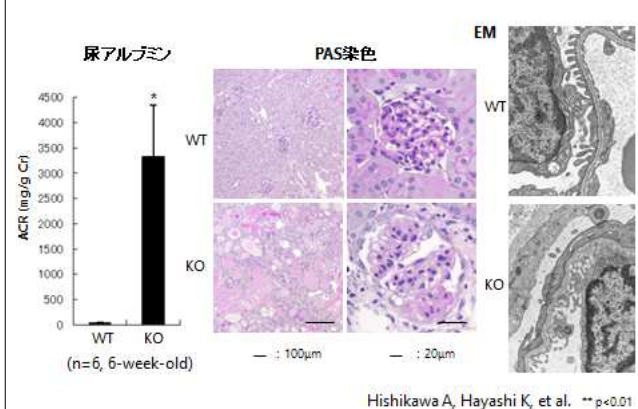
ヒト検体を用いた大規模データベース (nephroseq) を用いて、各種腎炎で糸球体の KAT5 発現の変動を調べたところ、糖尿病性腎症で有意に KAT5 発現が低下しており、腎生検検体を用いた免疫蛍光染色においても、糖尿病性腎症では KAT5 発現が低下していることが示唆された。

次に糖尿病モデルマウス (STZ 誘発性糖尿病モデル、db/db マウスモデル) を用いて検討した結果、ポドサイト KAT5 低下を認め、遺伝子導入法により低下した KAT5 を補充することにより尿アルブミンの改善、ポドサイト DSB の改善を認めた。

- またヒト培養ポドサイトを用いた検討の結果、
- ① 高糖条件によりポドサイト DSB は増加した。
 - ② UV 照射により惹起されたポドサイト DSB により、KAT5 発現は増加するが、高糖により惹起されたポドサイト DSB により KAT5 は増加せず、むしろ有意な低下を認めた。
 - ③ ポドサイトにおいて重要なスリット膜分子であるネフリンのプロモーター領域の同一部位において、KAT5 発現により DSB 低下を示唆する γ H2AX の低下と DNMT1 および DNMT3B 結合の低下、DNA メチル化低下が認められた (図4)。

以上から、高糖は KAT5 発現を負に調節しており、ポドサイトにおいて高糖に伴う DNA 損傷増加と修復因子 KAT5 低下が、一部 DNA メチル化亢進によるポドサイト形質遺伝子発現の低下、ポドサイト形質の変化を介して糖尿病性腎症の病態に関与していることが示唆された。すなわち**糖尿病性腎症においては KAT5 低下という DNA 損傷修復環境が DNA メチル化の変化を惹起している可能性**

図2 ポドサイト特異的KAT5ノックアウトマウス



TET1-3 の発現を検討すると、ノックアウトマウスでは

図3 誘導型ポドサイト特異的KAT5 ノックアウトマウス

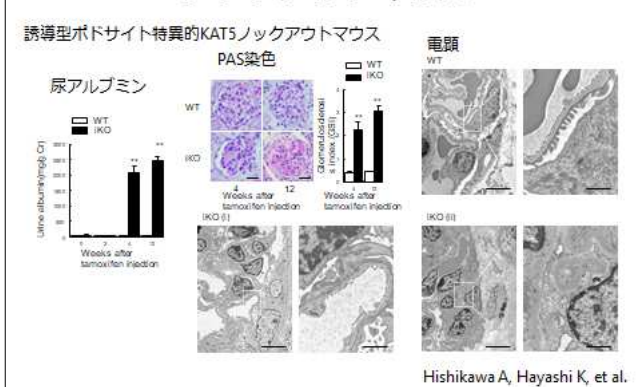
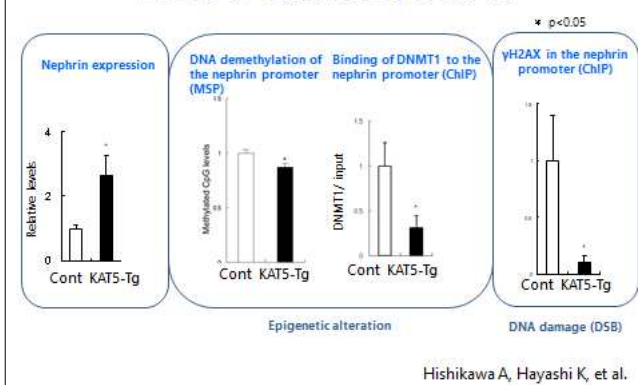


図4 KAT5を介したDNA修復は エピゲノム変化と関連する



すなわち**糖尿病性腎症においては KAT5 低下という DNA 損傷修復環境が DNA メチル化の変化を惹起している可能性**

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

が明らかになった(Hishikawa A, Hayashi K et al. Cell Rep, in press)。この成果に基づき、根本的治療法のない糖尿病性腎症において、ポドサイトの KAT5 あるいは DNA 損傷修復環境の是正が、新規治療標的となり得る可能性が期待される。

【今後の課題】

本研究により、in vivo の病態における DNA 損傷(特に DSB)修復と DNA メチル化変化の関連の一端が明らかになったが、DNA 損傷修復経路は多数存在しており、DNA 修復因子の発現に依存して、細胞種ごとに経路・機構は大きく異なると言われている。今後腎臓の各構成細胞における DNA 修復経路について検討することにより腎臓病の新たな治療アプローチとなる可能性がある。

また DNA メチル化を始めとしたエピゲノム変化が遺伝子特異的に惹起されるメカニズムについても更に検討が必要であると考え。我々の検討の結果では、DNA 損傷部位と DNA メチル化部位が関連していたこと、また DNA 損傷はクロマチン濃縮状態に関連していることが過去に報告されており、DNA メチル化変化の大きかったネフリンプロモーター領域は、クロマチンアクセシビリティ解析でオープンクロマチン状態であったことから、クロマチンアクセシビリティが関与していると考えており、今後の解析を予定している。

KAT5 が高糖により低下するメカニズムに関しては、高糖により KAT5 のプロモーター活性が低下することがルシフェラーゼアッセイにより示唆されているが、詳細な機序については今後の検討課題である。

第 5 回万有医学奨励賞－生活習慣病領域－
研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>

所 属	慶應義塾大学
氏 名	林 香

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> ・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究追加助成金交付後のものに限る。 ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。 ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 ・ 国内外雑誌を問わない。 ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 	
① <論文 PDF 添付あり>	
1	Akihito Hishikawa, <u>Kaori Hayashi</u> * and Hiroshi Itoh (*corresponding author) Transcription factors as therapeutic targets in chronic kidney disease <i>Molecules</i> 2018, 23(5). pii: E1123
2	<u>Kaori Hayashi</u> *, Michiyo Takayama, Takeshi Kanda, Kazuhiro Kashiwagi, Akihito Hishikawa, Yasushi Iwao, and Hiroshi Itoh (*corresponding author) <i>Association of kidney dysfunction with asymptomatic cerebrovascular abnormalities in a Japanese population with health checkups</i> <i>Circ J</i> , 2017 Jul 25;81(8):1191-1197
3	<u>Kaori Hayashi</u> *, Michiyo Takayama, Takayuki Abe, Takeshi Kanda, Hiroshi Hirose, Ryoko Shimizu-Hirota, Eisuke Shiomi, Yasushi Iwao, and Hiroshi Itoh (*corresponding author) <i>Investigation of metabolic factors associated with eGFR decline over one year in a Japanese population without CKD</i> <i>J Atheroscler Thromb</i> , 24(8):863-875, 2017
② <論文 PDF 添付なし>	
1	Akihito Hishikawa, <u>Kaori Hayashi</u> *, Takaya Abe, Mari Kaneko, Hideki Yokoi, Tatsuhiko Azegami, Mari Nakamura, Norifumi Yoshimoto, Takeshi Kanda, Yusuke Sakamaki, Hiroshi Itoh (*corresponding author) Decreased KAT5 expression impairs DNA repair and induces epigenetic changes in kidney podocytes. <i>Cell Rep.</i> 2018, in press
2	Hiroshi Itoh, <u>Kaori Hayashi</u> , Kazutoshi Miyashita Pre-emptive medicine of hypertension and its prospect <i>Hypertens Res.</i> 2018, in press
3	Tatsuhiko Azegami, Yoshikazu Yuki, <u>Kaori Hayashi</u> , Akihito Hishikawa, Shin-ichi Sawada, Kazuya Ishige, Kazunari Akiyoshi, Hiroshi Kiyono, Hiroshi Itoh. Intranasal vaccination against angiotensin II type 1 receptor and pneumococcal surface protein A attenuates hypertension and pneumococcal infection in rodents. <i>J Hypertens.</i> 36 (2) 387-394, 2018
4	Michiyo Takayama, Koichiro Azuma, <u>Kaori Hayashi</u> , Ryoko Shimizu-Hirota, Kanako Makino, Rieko Bessho, Toshifumi Yoshida, Kazuhiro Kashiwagi, Hiroshi Hirose, Nagamu Inoue, Yasushi Iwao Relationship between sarcopenic obesity and metabolic syndrome among Japanese elderly who underwent a comprehensive health checkup <i>Japan Society of Health Evaluation and Promotion</i> , Vol 44 (4), 587-593, 2017

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究追加助成金交付後のものに限る。 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 国内外を問わない。 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2017.9.14	<u>Kaori Hayashi</u> DNA damage response and epigenetic changes in ‘cardiometabolic memory’ American Heart Association Council on Hypertension, Asian/ Pacific Hypertension Research Symposium (invited speaker)
2	2017.11.4	Akihito Hishikawa, <u>Kaori Hayashi</u> , Toshiaki Monkawa, Hiroshi Itoh KAT5-mediated DNA damage repair is essential for the maintenance of podocytes American Society of Nephrology Kidney Week 2017
3	2017.11.4	<u>Kaori Hayashi</u> Session: Podocyte replenishment and repair Kruppel-like factor 4 and Epigenetic Phenotypic Podocyte Modulation American Society of Nephrology Kidney Week 2017 (invited speaker)
4	2018.9.22	Akihito Hishikawa, <u>Kaori Hayashi</u> , Hiroshi Itoh KAT5 plays a key role in DNA damage repair and epigenetic regulation in kidney podocytes International Society of Hypertension APSH First prize, ISH Best oral presentation award
5	2018.10.28	Hishikawa A, <u>Hayashi K</u> , Yoshimoto N, Itoh H. Decreased KAT5 expression impairs DNA repair and induces DNA methylation in diabetic nephropathy podocytes. (oral presentation) American Society of Nephrology Kidney Week 2018
6	2017.5.27	菱川彰人、 <u>林 香</u> 、中村真理、畔上達彦、伊藤裕 Epigenetic modulation through histone acetyltransferase KAT5 in podocytes 第 60 回日本腎臓学会学術総会(総会長奨励賞受賞)
7	2018.3.3	<u>林 香</u> ポドサイト形質のエピゲノム調節機構とCKDの病態における役割 第 2 回ポドサイト研究会(講演)
8	2018.3.29	菱川彰人、 <u>林 香</u> 、中村真理、畔上達彦、吉本憲史、伊藤裕 腎糸球体ポドサイトにおける DNA 修復因子 KAT5 発現の低下は DNA 修復不全に関連したエピゲノム変化を惹起し、糖尿病性腎症の病態に關与する 第 22 回心血管内分泌代謝学会学術総会(YIA 受賞)
9	2018.6.8	菱川彰人、 <u>林 香</u> 、中村真理、畔上達彦、吉本憲史、伊藤裕 DNA 修復因子 KAT5 はポドサイトの形質維持に必須である 第 61 回日本腎臓学会学術総会(口演)
10	2018.9.14	菱川彰人、 <u>林 香</u> 、中村真理、畔上達彦、吉本憲史、伊藤裕 DNA 修復因子 KAT5 はポドサイトの形質維持に必須であり、その低下が糖尿病性腎症の病態に關与する 第 41 回日本高血圧学会総会(JSH/SHR 学会合同セッション最優秀賞)
3. 投稿、発表予定(投稿中の論文も含める)		

	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1		
2		
3		
4		