

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09680

研究課題名(和文)単球-上皮細胞間のヒストン修飾・インフラマソームを介した炎症の悪循環の病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of the vicious cycle of inflammation through histone modification and inflammasomes between monocytes and epithelial cells

研究代表者

藤野 貴行 (Fujino, Takayuki)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70322914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、LPS刺激腹腔内マクロファージ由来サイトカインおよびドキシソルピシンによる外因性ROS刺激に対する、ポドサイト障害および副腎皮質からの副腎皮質ホルモン産生障害に対して、活性化した転写マーカーであるH3K4me3、細胞障害に対して保護的な作用を有するapurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1)の役割を検討した。ヒストンH3K4me3と拮抗する作用を示すAPE1は、ミトコンドリアにおけるNOX4発現調節や、内因性ROSおよびアルドステロン産生を介して、外因性の炎症およびROS刺激の組織特異的なセンサーである可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミネラルコルチコイドレベル低下は、敗血症性ショックに認められ、高い死亡率と関連している。ドキシソルピシン(DOX)は、一般的に使用される抗腫瘍剤であるが、長期治療では、精巢毒性およびそれとともなうステロイド形成抑制を含む有害な副作用によって大きく制限される。免疫グロブリンG4(IgG4)関連疾患(IgG4-RD)は、腎臓に対して線維炎症状態を示す疾患である。ループス腎炎(LN)は、既存の治療では、患者の10～20%は診断後5年以内に末期腎不全に進行する。炎症刺激に対する糸球体腎炎および副腎でのステロイドホルモン産生の病態生理におけるヒストントリメチル化修飾(H3K4me3)の役割を解明した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of histone H3K4 trimethylation (H3K4me3) as a marker of active euchromatic regions and the role ofapurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) having protective ability against cell damage in aldosterone production from adrenal cortical cells and function of podocytes under conditions stimulated by inflammatory cytokines derived from LPS-stimulated peritoneal macrophages (pMAC-Cytokine) or by exogenous ROS with doxorubicin treatment. Histone H3K4me3 and its antagonistic effects of APE1 may be involved in the tissue-specific sensing mechanism responsible for the exogenous inflammatory cytokines and ROS through the regulation of mitochondrial NOX4 and the subsequent changes in endogenous production of ROS and aldosterone production.

研究分野：腎臓内科

キーワード：エピゲネティック修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1-1)

ヒストン修飾は、遺伝子発現の変化と相関するクロマチン構造の変化と関係がある。重要なことに、リジン4上のヒストンH3のトリメチル化(H3K4me3)は、活性部位であるヘテロクロマチンで認め、不活性部位では認められない。

(1-2)

敗血症性ショックにおける機能性副腎不全の問題は、多くの注目を集めている。ミネラルコルチコイドレベル低下は、敗血症性ショックの重症成人に認められ、高レニン症低アルドステロン症は高い死亡率と関連している。小児集中治療室で治療した髄膜炎球菌性疾患症例において、他の疾患患者と比較して、血漿アルドステロン濃度が低いことが報告されている。敗血症におけるサイトカインを介したアルドステロン合成抑制のメカニズムは、いくつかの報告が認められる。ヒト髄膜炎球菌敗血症の患者では、種々の血中炎症性サイトカインレベル上昇を認めている。サイトカインIL-1およびTNFは、精巣細胞および卵巣顆粒細胞のステロイド産生を抑制することが示されている。ヒトのアルドステロン放出がサイトカインによって制御されるという証拠は現在までにはないが、ラット副腎細胞を用いた *in vitro* 研究では、TNFがアルドステロン放出を抑制することが示されている。したがって、炎症性サイトカインおよび随伴する細胞内ROS産生は、ステロイド産生に著しく寄与し得る。アントラサイクリン系抗生物質であるドキソルビシン(DOX)の長期使用は、精巣毒性およびそれにとまなうステロイド形成抑制を含む有害な副作用によって大きく制限される。活性酸素種(ROS)の産生増加は、DOXによる精巣毒性およびステロイド産生抑制を担う主なメカニズムとみなされている。細胞傷害性を示すDOXによるROS産生の増加は、脂質過酸化、デオキシリボ核酸(DNA)断片化、その結果、精子細胞における壊死およびアポトーシス、その後のステロイド産生抑制につながる。これらサイトカインおよび外因性ROSによるステロイド産生抑制におけるH3K4me3が関わるメカニズムは不明である。

(2)

低酸素症と炎症との病態生理は連関することが、炎症性疾患の解析で示されている。直接酸素を感知するヒストン脱メチル化酵素のKDM5Aは、標的であるヒストンH3K4me3の変化による転写調節を介して、腎疾患の病因にも関与していると推測される。NADPHオキシダーゼアイソフォーム4(NOX4)は、内因性ROS発生の主要因子であり、心筋および神経上皮細胞のミトコンドリアに局在し、生理酸素レベルのセンサとして機能することが報告されている。糖尿病性腎症におけるROS依存性ポドサイト損傷を促進する。活性酸素ROS刺激によるグリコーゲンシンターゼキナーゼ3(GSK3-)の活性化はROS産生の悪循環および細胞損傷を引き起こすことが、糸球体上皮細胞や、共通した構造を有する神経細胞で報告されている。ポドサイトでGSK3を阻害することは、様々な動物モデルの腎疾患に対して治療的に有益であることが報告されている。臨床現場で使用される最も一般的なGSK3阻害剤であるリチウムは、長期間この薬剤を与えられた一部の患者において糸球体硬化症および末期腎不全を引き起こすことが示されている。最近、GSK3は、ポドサイトを分化した状態で維持し、細胞周期に再突入しHIPPO経路信号によって変調された有糸分裂を起こさないようにする働きをすることが報告されている。これらの知見から、ポドサイトにおけるGSK3 / 活性の過剰な抑制は糸球体および腎傷害につながることを示されている。しかしながら、実験モデルにおけるサイトカインに応答する酸化ストレ

ス産生の調節因子としての H3K4me3 の関わりは、糸球体腎炎および副腎皮質機能低下の病態において関連するのか、また臓器特異的な差異を生ずるかは依然として不明である。低酸素と炎症のクロストールする状態において、H3K4me3 やそれにより誘導されるメディエーターの働きや位置づけは不明である。これらメディエーターと H3k4me3 が副作用軽減の改善のための治療標的となるかは重要である。

(3)

免疫グロブリン G4(IgG4)関連疾患(IgG4-RD)は、ほぼすべての臓器に影響を与える線維炎状態であり、しばしば好酸球増加症および IgE および IgG4 のレベルの増加に関連する。

組織におけるTh2関連およびTreg関連サイトカインの過剰発現も報告されている。活動性である未治療のIgG4-RD患者において、T細胞の分析により、影響を受けた組織に侵入した細胞傷害性CD4+T細胞は、クローン的に増加し、末梢血中のIL-1、TGF- β 1、IFN- γ を産生することが明らかになっている。このような高サイトカイン状態である炎症病態における腎障害の機序に対するH3k4me3の役割は不明である。

(4-1)

全身性エリテマトーシス(SLE)は、T細胞活性化およびB細胞過剰刺激によって特徴付けられ、制御が解除されたT細胞活性化は、炎症性サイトカイン、自己抗体産生、および異常な炎症反応の増加をもたらす。SLEの発症に寄与する。ループス腎炎(LN)はSLEの主要な症候の一つである。既存の治療はLN予後を改善したが、LN患者の50~70%だけが寛解を達成し、患者の10~20%は診断後5年以内に末期腎不全に進行する。新規かつ効果的な治療戦略を特定するためには、LNの詳細な病態メカニズムを明らかにする必要がある。健康なコントロールと比較して、SLE患者のCD4+およびCD8+T、CD19+B、およびCD14+単球において、Toll-like受容体2活性化がインターロイキン17Aプロモーター領域におけるヒストンH3K4トリメチル化レベルをアップレギュレートすることを示した。単球はSLEで顕著に変化するにもかかわらず、転写開始部位におけるヒストンH3K4me3パターンは、SLEの患者からの単球で顕著に変化していなかった。したがって、ヒストンH3K4me3パターン自体は、SLE単球において報告間で結果に差異があったが、これらの所見や臨床所見の差異を調節する、SLEの炎症におけるH3K4me3マークを調節する因子の存在が示唆されるが、不明である。このようにヒストン修飾の病態への関わりが多様性を調節する因子や機序は不明である。

(4-2)

ポドサイトは糸球体の中で最大の細胞であり、腎臓の糸球体濾過バリアーに寄与する。ポドサイトは、ループス腎炎(LN)における病理学的病変の一部として記述されている。典型的な免疫複合体の沈着を認めない蛋白尿性ループス腎炎患者においては、広範囲のポドサイト癒合を認め、ポドサイト障害に対する循環血液中のサイトカインの役割を示唆している。14年間の生検レジストリを調べた以前のレポートでは、すべてのLN生検の1.3%が上記のポドサイト障害型に分類され、LNにおけるポドサイト障害の割合が比較的低いことを示されている。我々は以前に、ヒストンH3K4me3レベルがリポ多糖(LPS)治療マウスおよび特発性膜性腎症(IMN)の患者のポドサイトで上昇し、ポドサイト腫脹および血清クレアチニン、尿アルブミンレベルの上昇との関連を報告した。我々の結果は、MLL3媒介H3K4メチル化の重要な機能を示し、ポドサイト

損傷における H3K4 me3 の新しい役割を示した。PTIP はヒストン H3K4 メチルトランスフェラーゼ複合体酵素活性に必要な成分である。PTIP ノックアウトマウスは、尿アルブミンレベルの増加とポドサイトの形態学的異常を示し、PTIP を介する H3K4 me3 が、ポドサイトの機能および形態維持作用に寄与することが示された。腎損傷の程度など個人間の LN 表現型変動を支配する因子は、明らかになっていない。ポドサイトにおける H3k4me3 の役割は、報告されているが、障害の多様性への役割は不明である。

(5)

APE1 Apurinic/aprimidinic endonuclease 1(APE1)は、非毒性レベルの ROS によって選択的に活性化され、酸化によって損傷した DNA に対して合成のためのプライマーを提供することにより、塩基切除修復に寄与し、Rac-1 を介した NADPH oxidase の抑制にも寄与する。以前の研究では、APE-1 はアルドステロン産生酵素である CYP11B2 の抑制作用が示されている。以前の研究では、抗 APE1 抗体は、SLE 患者の血清において特異的に検出されたが、他の自己免疫疾患または正常な健康コントロールでは検出されなかった。しかしながら、糸球体腎炎およびステロイドホルモン産生の病態における APE1 の役割は未知のままである。また APE1 のヒストンメチル化への関与は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、LPS 刺激腹腔内マクロファージ由来サイトカインおよびドキシソルピシンによる外因性 ROS 刺激に対する、ポドサイト障害および副腎皮質からの副腎皮質ホルモン産生障害に対して、活性化した転写マーカーである H3K4me3、細胞障害に対して保護的な作用を有する apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1)の役割を検討した。

3. 研究の方法

LPS 刺激腹膜マクロファージ(pMAC-サイトカイン)に由来するサイトカインで刺激された炎症状態下、またはドキシソルピシンを用いた外因性 ROS による刺激条件下において、副腎皮質からのアルドステロン産生の機能および糸球体のポドサイトの機能における H3K4me3 の役割を調べた。副腎皮質培養細胞及び静脈内注入ドキシソルピシンマウスモデル及び培養ポドサイトおよび LPS マウスモデル及びループス腎炎(LN)マウスモデルを調べ、IgG4RD および LN 患者からの腎組織サンプルを調べた。また、MLL3 媒介性 H3K4me3 と APE1 とミトコンドリア NOX4 が介在した ROS 生産との関連を、これらの条件下で検討した。

4. 研究成果

炎症性サイトカインや活性酸素種は、敗血症およびドキシソルピシンによる副腎ステロイドホルモン産生に影響し、IgG4 関連疾患およびループス腎炎のポドサイト障害に関連する。本研究では、LPS 刺激腹腔内マクロファージ由来サイトカインおよびドキシソルピシンによる外因性 ROS 刺激に対する、ポドサイト障害および副腎皮質からの副腎皮質ホルモン産生障害に対して、活性化した転写マーカーである H3K4me3、細胞障害に対して保護的な作用を有する apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1)の役割を検討した。腹腔内マクロファージ由来-サイトカイン(pMAC-Cytokine)の刺激により、ポドサイトにおける H3K4me3 上昇は、副腎皮質細胞における低下とは対照的であった。ミトコンドリアにおける NOX4 や CYP11B2 発現、細胞質におけるチロシン 216 リン酸化 GSK3β 発現変化、ROS 産生、培養上清におけるアルドステロン濃度は、NOX4 プロモーター領域における H3K4me3 レベルの変化と一致していた。APE1 shRNA は副腎皮質細胞および培養ポドサイトにおいて、pMAC-サイトカイン刺激の状態、ヒストン

H3K4me3 レベルを増加させた。DOX で処置したマウスでは、アルドステロンレベルの低下とともに、副腎皮質組織における H3K4me3/NOX4/CYP11 β /SOD1 の共発現が低下した。LPS 刺激マウスおよび IgG4 関連疾患の腎臓において、ヒストン H3K4me3 レベルの増加は、ポドサイト腫大やミトコンドリアにおける NOX4 発現を示した。APE1 のポドサイトにおける発現は、LN マウスモデルおよび膜型 LN において、H3K4me3 発現およびポドサイト腫大と負の相関を認めた。ヒストン H3K4me3 と拮抗する作用を示す APE1 は、ミトコンドリアにおける NOX4 発現調節や、内因性 ROS およびアルドステロン産生を介して、外因性の炎症および ROS 刺激の組織特異的なセンサーである可能性がある。本研究では、LPS 刺激腹腔内マクロファージ由来サイトカインおよびドキシソルピシンによる外因性 ROS 刺激に対する、ポドサイト障害および副腎皮質からの副腎皮質ホルモン産生障害に対して、活性化した転写マーカーである H3K4me3、細胞障害に対して保護的な作用を有する apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) の役割を検討した。ヒストン H3K4me3 と拮抗する作用を示す APE1 は、ミトコンドリアにおける NOX4 発現調節や、内因性 ROS およびアルドステロン産生を介して、外因性の炎症および ROS 刺激の組織特異的なセンサーである可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤野貴行
2. 発表標題 LPSモデルでの尿蛋白・腎機能・ポドサイト腫大におけるヒストンH3-K4トリメチル化の役割 GSK3 発現変化との関連
3. 学会等名 日本腎臓学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤野貴行
2. 発表標題 尿蛋白・腎機能・ポドサイト腫大におけるヒストンH3-K4トリメチル化の役割 GSK3 発現と酸化ストレス産生との関連
3. 学会等名 日本高血圧学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤野貴行
2. 発表標題 副腎機能におけるAPE-1/Ref-1の役割 H3K4トリメチル化の関わり
3. 学会等名 日本腫瘍循環器学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤野貴行
2. 発表標題 LPSモデルでの尿蛋白・腎機能・ポドサイト腫大におけるヒストンH3-K4トリメチル化の役割 GSK3 発現変化の関連
3. 学会等名 日本腎臓学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤野貴行
2. 発表標題 尿蛋白・腎機能・ポドサイト腫大におけるヒストンH3-K4トリメチル化の役割 GSK3 発現と酸化ストレス産生との関連
3. 学会等名 日本高血圧学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤野貴行
2. 発表標題 Altering a Histone H3K4 Methylation and Associated NADPH Oxidase 4 Transcription and Reactive Oxygen Species Production in Glomerular Podocytes Promotes Cytokine-induced Glomerulonephritis.
3. 学会等名 日本循環器学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長谷部 直幸 (Hasebe Naoyuki) (30192272)	旭川医科大学・医学部・教授 (10107)	