

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08261

研究課題名(和文)腎臓障害をきたすNAD合成系異常における エピジェネティクスの役割解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of epigenetics in abnormalities in NAD synthesis leading to kidney damage

研究代表者

アリフ・ウル ハサン (Hasan, Arif Ul)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：00570368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本実験は、急性腎障害や糖尿病性慢性腎臓病におけるNAD合成に対するエピジェネティクスの役割を調査するために実施した。健康な被験者と糖尿病患者から収集された腎臓の単一核 RNA シーケンスデータから急性腎障害および糖尿病性慢性腎臓病の患者の腎臓では、NAD 合成経路に関連する遺伝子が調節不全になっている事を解明した。ヒト腎上皮細胞を使用して、ヒストン脱アセチル化とヒストン脱メチル化の阻害剤はNAD合成に関連するいくつかの遺伝子の発現が増強させNADを増加させる。更に、これらの介入は腎臓障害のマーカーの発現を減少させる。以上から、ヒストン系の阻害薬は腎臓障害を改善される可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性腎障害は死亡率が高いため、慢性腎臓病の原因になる。しかし、急性腎障害の成立メカニズムには不明な部分が多く残されており、解明すれば新たな治療標的になる。一方、糖尿病性腎症は慢性腎臓病の主要疾患である。近年の研究で、NADの投与により腎障害が回復することが証明されたが、その機能はまだ不明である。がんではエピジェネティクス異常を標的とした診断・治療が臨床応用されているが、生活習慣病でもエピジェネティック異常の病的意義が次第に解明され診断・治療の標的として注目されている。本研究により結果は腎障害に起因するNAD合成の異常に関わる鍵となり、エピジェネティック修飾は新たな治療方法の可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to investigate the role of epigenetics on NAD synthesis in acute kidney injury and chronic kidney disease caused by diabetes. Single-nuclear RNA sequencing data available in public database from kidneys collected from healthy subjects and diabetic patients revealed that genes related to the NAD synthesis pathway were dysregulated in the kidneys of patients with acute kidney injury and diabetic chronic kidney disease. Using human renal epithelial cells, inhibitors of histone deacetylation and histone demethylation increased NAD production by upregulating the expression of several genes related to NAD synthesis. Furthermore, these interventions reduced the expression of markers of kidney injury. These results suggest that inhibitors of the histone system may improve kidney injury.

研究分野：Genetics

キーワード：NAD合成 エピジェネティクス 急性腎障害 糖尿病性腎症 低酸素症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

急性腎障害 (acute kidney injury: AKI) は腎臓機能のみならず生命予後に大きく影響し、たとえば心臓手術後に発症すると死亡率は 30% に達する (AKI 診療ガイドライン 2016)。腎血流の低下による虚血性損傷が AKI の主要な原因であるが有効な治療手段は限られている。また、腎臓虚血は慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD) の原因となるが、その進展機構には不明な点が多く残されている。糖尿病性腎症は CKD の主要疾患であり、傍尿細管毛細血管障害と近位尿細管グルコース再吸収亢進に基づく低酸素状態が腎症進展に大きく関わることが示されている。しかし、AKI の成立メカニズムには不明な部分が多く残されており、解明すれば新たな治療標的になる。最近 AKI への NAD 合成系低下の関与が示されたが、その調節機構はいまだ不明である。これまでの予備的検討で、NAD 合成系がヒストン脱アセチル化やヒストン脱メチル化阻害薬で増強すること、糖尿病による CKD 患者の近位尿細管では NAD 合成系の複数の遺伝子に DNA メチル化が増強して抑制がかかっていることを見出した。これらの結果を基にしてエピジェネティックの修飾は AKI と CKD で減少している NAD 合成を製造される可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

エピジェネティクス機構は、DNA 配列を変えずに遺伝子の発現を制御する仕組みで、遺伝子スイッチとして働くが、エピジェネティクス系の遺伝様々な病気に大きく変化し、臓器特異的な遺伝子発現に重要な役割をはたす。特に、リジンのメチル化はそうした修飾の 1 つで、ゲノムの構成、およびゲノムの活性領域や不活性領域の形成を左右する重要な決定因子である。リジンのメチル化は、転写活性化 (H3K4、K36、K79) と転写抑制 (H3K9、K27、H4K20) の両方に関与し、メチル化の程度は異なる結果をもたらす。一方、NAD は細胞の主要な酵素であり、代謝において重要な役割を果たしている。NAD はいくつかの経路 (主に de novo 経路とサルベージ経路) で合成され、またいくつかの経路で代謝される。そのため、本実験では腎臓疾患における NAD 合成の異常に主に焦点を当てた。本研究は、「腎機能低下をきたす NAD 合成低下にどのようにヒストンアセチル化やヒストンメチル化の機構が関わるのか」という問いを解明し、新たな AKI、CKD に対する治療手段を提供することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト尿細管上皮細胞 (HK2 細胞) で、糖尿病モデルである、培地に Glucose を加えて NAD 合成酵素の発現、これらに関わる遺伝子の発現をリアルタイム PCR、western blot で解析した。さらに、ヒストン脱アセチル化とヒストン脱メチル化阻害薬・ヒストンアセチル化とヒストンメチル化に対する遺伝子に転写因子 siRNA の効果を調べ、糖尿によって NAD 合成酵素系に生じる異常およびヒストンメチル化阻害薬が効果を発揮する分子機構を解明した。

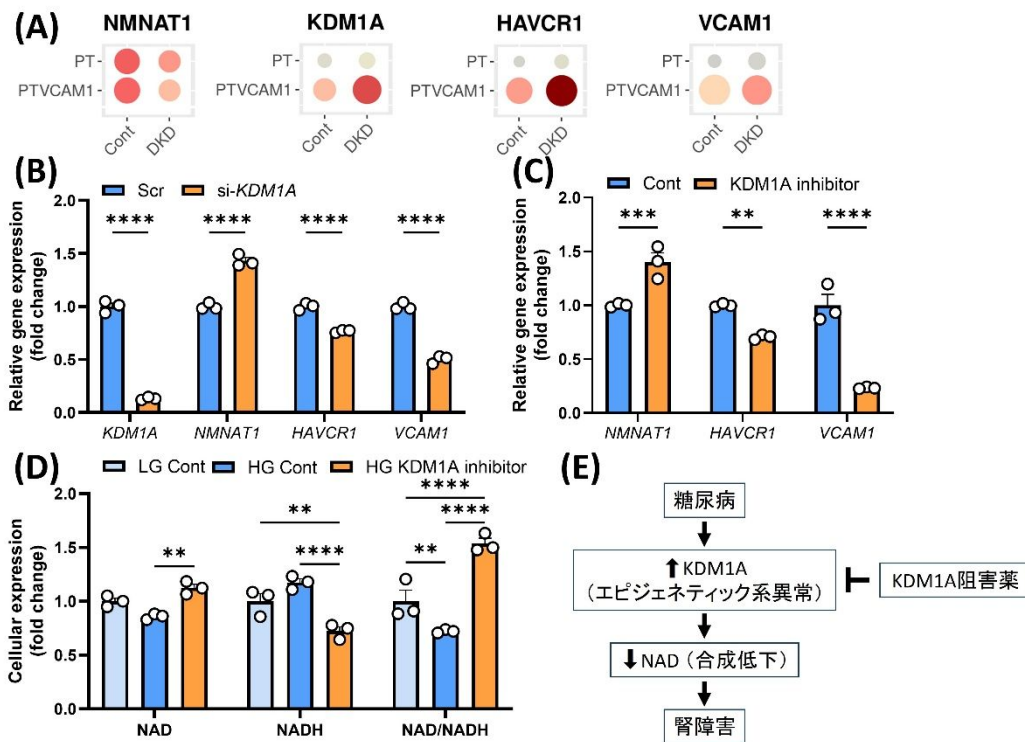
(2) 糖尿病を引き起こす為に ddY マウスに Glucose を含む飲料水を投与した。血糖値、インスリン、炎症マーカーを測定する為に、血液や血漿を採取した。NAD 合成酵素の発現、ヒストンおよびメチル化異常をリアルタイム PCR 解析する (進行中)。

(3) 予定通り糖尿病性腎症患者の腎症生検組織から、近位尿細管細胞をレーザーマイクロダイセクションにより分取する事を行われなかったため公開データベースを使用して NAD 合成系、ヒストンアセチル化とヒストンメチル化系の遺伝子の発現を解析して糖尿病に関わる遺伝子確認した。

### 4. 研究成果

(1) ヒトの腎臓の単一核 RNA シーケンスデータの解析:

NAD 合成は複雑なプロセスであり、多くの遺伝子が関与しているため、最初は、公開されているデータベース (<https://humphreyslab.com/SingleCell/>) を使用して糖尿病腎臓の遺伝子変化を調査した。このデータベースでは、健康な被験者と糖尿病患者から収集された腎臓の単一核 RNA シーケンスデータを提供されている。ヒト糖尿病腎臓ではいくつかの候補遺伝子を検出した。その中で、在的なターゲットである NMNAT1 も含まれていた。NMNAT1 は、de novo 経路と salvage 経路の両方で NAD 合成の最終段階で中心的な役割を果たす重要な酵素である。一方、ヒストンを脱メチル化する KDM1A の発現が増加していた。また、予想どおり、腎臓障害のマーカーである HAVCR1 と VCAM1 の発現も増加していた (図 A)。これら結果をまとめて、KDM1A を阻害すれば NMNAT1 の発現を改善し、それによって NAD 合成を増加させることができる適切なターゲットであると考えられる。



( 2 ) KDM1A の遺伝子抑制は NMNAT1 の発現に制御する

明らかにした KDM1A が NMNAT1 の発現に影響を与えるかどうかを調べるために、ヒト尿細管上皮細胞 (HK2 細胞) で KDM1A をサイレンシングした。このサイレンシングによって NMNAT1 の発現が実際に増加、そして、HAVCR1 と VCAM1 の発現の減少した。この発見の変化は、KDM1A 阻害が糖尿病性腎症に対する治療効果をもたらす可能性があることを示唆している ( 図 B )。

( 3 ) KDM1A の阻害薬は NAD 合成を促進する

この段階では、KDM1A の化学的阻害によって NAD の産生が増加し、NAD 合成に関与する遺伝子の発現が改善され治療方法として利用できるか検討した。サイレンシングと同様に、KDM1A 阻害剤は実際に NMNAT の発現を増加させ、HAVCR1 と VCAM1 を減少させた ( 図 C )。さらに、阻害剤は NAD の産生を増加させ、NADH を減少させ、NAD/NADH 比の純上方制御をもたらせた ( 図 D )。以上から、KDM1A の阻害薬は腎障害を改善される可能性を明らかにした ( 図 E )。

( 4 ) HDAC 阻害剤は de novo 経路を介して NAD を合成する

一方、急性腎障害における NAD 合成に対するエピジェネティクスの役割を調査するために実施した。ヒト腎上皮細胞を使用して、低酸素症がヒストン脱アセチル化酵素に関連する遺伝子を変化させることを見つかり出した。そのため、汎 HDAC 阻害剤を使用したところ、この介入により NAD 合成の de novo 経路に関連するいくつかの遺伝子の発現が増強されることを発見した。一貫して、HDAC 遺伝子のサイレンシングでも同様の効果が得られ、de novo 経路を介した NAD 合成に対する HDAC 阻害の有益な役割が確認した ( 原稿準備中 )。心不全は腎性低酸素症の主な原因の 1 つであるため、同じエピジェネティック介入が心筋細胞に与える影響を同時に評価した。興味深いことに、HDAC9 とエピジェネティック系の BET タンパク質阻害剤 (Brd2 と Brd4) が相互作用して脂肪酸輸送を変化させることが新たに判明した (Hasan et al. BBRC, 693 (2024) 149370)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hasan Arif Ul, Obara Mami, Sato Sachiko, Kondo Yukiko, Taira Eiichi	4. 巻 693
2. 論文標題 CD146/MCAM links doxorubicin-induced epigenetic dysregulation to the impaired fatty acid transportation in H9c2 cardiomyoblasts	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149370 ~ 149370
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.149370	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takenaka Tsuneo, Hasan Arif, Marumo Takeshi, Inoue Tsutomu, Miyazaki Takashi, Suzuki Hiromichi, Kurosaki Yoshifumi, Ishii Naohito, Nishiyama Akira, Hayashi Matsuhiko	4. 巻 48
2. 論文標題 Klotho Supplementation Reverses Renal Dysfunction and Interstitial Fibrosis in Remnant Kidney	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Kidney and Blood Pressure Research	6. 最初と最後の頁 326 ~ 337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000530469	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hasan Arif Ul, Obara Mami, Sato Sachiko, Kondo Yukiko, Taira Eiichi
2. 発表標題 Epigenetic regulation of CD146/MCAM ameliorates doxorubicin-induced dysregulation of Fabp4 on H9c2 cardiomyoblasts
3. 学会等名 第74回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2023年 ~ 2024年

1. 発表者名 平田 翔、長瀬 由佳子、ハサン アリフ ウル、佐藤 幸子、小原 真美、近藤 ゆき子、平 英一
2. 発表標題 KDM4阻害剤であるNCG00244536はB16メラノーマ細胞の増殖を抑制する
3. 学会等名 第74回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2023年 ~ 2024年

1. 発表者名 ハサン アリフ ウル、丸茂 丈史、小原 真美、佐藤 幸子、近藤 ゆき子、村瀬 真一、平 英一
2. 発表標題 Inhibition of histone demethylation augments NAD synthesis through the Preiss-Handle rpathway in cultured human proximal tubular epithelial cell line
3. 学会等名 The 96th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 佐藤 幸子、ハサン アリフ ウル、小原 真美、平 英一
2. 発表標題 Dietary sucrose-mediated inhibition of pyroptosis in intestinal epithelial cells precipitates obesity
3. 学会等名 The 100th Anniversary Annual Meeting of The Physiological Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 ハサン アリフ ウル、三宅克也、村瀬真一、丸茂 丈史
2. 発表標題 HDAC inhibitors augment de novo NAD synthesis in renal proximal epithelial cells
3. 学会等名 11th Academic Conference of International University of Health and Welfare University Conference, 2021, Tokyo, Japan
4. 発表年 2021年～2022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	丸茂 丈史  (Marumo Takeshi)  (70265817)	国際医療福祉大学・医学部・教授   (32206)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------