

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16221

研究課題名（和文）ヒストン修飾によるマクロファージの機能変化を介した、腎線維化に対する治療法の開発

研究課題名（英文）Development of the Treatment for Renal Fibrosis Mediated by Histone Modifications that Alter Macrophage Function

研究代表者

佐々木 健介（Sasaki, Kensuke）

広島大学・病院（医）・助教

研究者番号：40770326

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マクロファージ（M₁）におけるヒストンメチル化酵素SET7/9の腎線維化への関与とSET7/9のもつ免疫記憶が腎線維化に与える影響を明らかにする。

腎線維化モデルではSET7/9の発現は時間の経過と共に尿細管細胞から間質細胞へと移動しており、それは免疫細胞であるM₁ マーカーと一致していた。さらに、新しい技術を用いて作製したSET7/9ノックアウトマウスでは腎線維化が抑制されていたため、今後は腎組織から腎M₁ や骨髄細胞を抽出し極性や性質変化を評価する。さらにM₁ 特異的SET7/9-KOを使用し、SET7/9のもつ免疫記憶が腎線維化に与える影響を明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、マクロファージ（M₁）の環境や刺激による変化には、エピジェネティックな遺伝子制御が関与することが報告されており、本研究は、エピジェネティックなヒストンメチル化酵素SET7/9のもつ“免疫記憶”への変化が腎線維化にどのような影響を与えるのかを明らかにする。免疫細胞をターゲットとした治療法は免疫チェックポイント阻害薬やCAR-T細胞療法、CAR-M細胞療法など近年注目されてきており、本研究によりM₁ を用いた治療法が腎不全の分野でも臨床応用につながれば、新たな腎疾患治療薬となりうる。

研究成果の概要（英文）：This study elucidates the involvement of the histone methyltransferase SET7/9 in renal fibrosis within macrophages (M₁) and investigates the impact of SET7/9-mediated immune memory on renal fibrosis.

In the renal fibrosis model, the expression of SET7/9 translocates from tubular cells to interstitial cells over time, aligning with markers of immune cells, specifically M₁. Furthermore, renal fibrosis was suppressed in SET7/9 knockout mice, generated using newly developed techniques, prompting further evaluation of polarity and phenotypic alterations in renal M₁ and bone marrow cells extracted from renal tissues. Additionally, the utilization of M₁-specific SET7/9 knockout models will facilitate the exploration of the immunomodulatory effects conferred by SET7/9-mediated immune memory on renal fibrosis.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：マクロファージ epigenetics 免疫記憶 SET7/9

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎線維化は、末期腎不全に至るすべての腎疾患に共通する治療ターゲットであり、Mφは、腎損傷修復線維化の全プロセスに大きく関与している。Mφの傷害組織への浸潤は、腎線維化と相関するが (Eardley KS. *Kidney Int.* 2006), Mφの除去が腎線維化に与える影響は単純ではなく、Mφ除去のタイミング (Lee S. *J Am Soc Nephrol.* 2011) や除去方法 (Ferenbach DA. *Kidney Int.* 2012) により影響は異なっているため、その詳細な機序については未解明である。研究代表者は、M2 分極の主要制御因子 IRF4 が Mφの遊走/浸潤能に与える影響に着目し、Mφの IRF4 阻害は AKT を介した Mφの遊走能を抑制し腎線維化が改善すること (Sasaki K, *JCI Insight* 2022, Sasaki K, *J Am Soc Nephrol* 2021), さらに腎線維化マウスにおいて、TGF- β 1 誘導のエピジェネティックなヒストンメチル化酵素 SET7/9 を特異的に阻害すると、線維化遺伝子特異的にヒストン H3K4 モノメチル化が抑制され、腎線維症が改善することを報告した (Sasaki K, *J Am Soc Nephrol* 2016)。SET7/9 は、“Trained immunity” と言われる免疫記憶を行うプロセスにおいて重要であることが報告されている。本研究では、ヒストンメチル化酵素 SET7/9 が Mφの機能に与える影響に着目し、Mφの遊走/浸潤能や貪食能、MMT に加え、特に SET7/9 もつ “Trained immunity” への変化が腎線維化にどのような影響を与えるのかを明らかにする。

2. 研究の目的

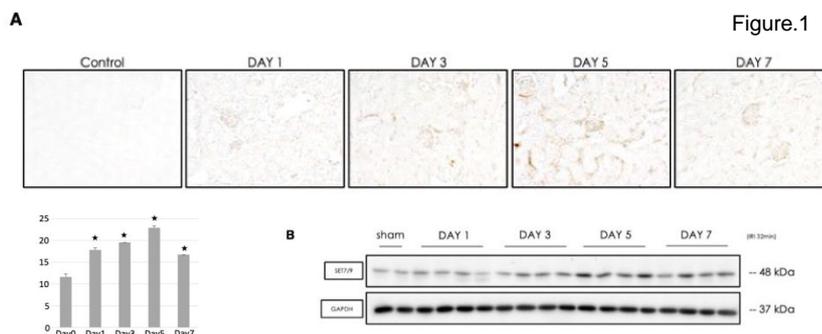
本研究では、Mφにおけるヒストンメチル化酵素 SET7/9 の腎線維化への関与を明らかにし、Mφの SET7/9 阻害が Mφの表現型や機能、そして他の細胞集団に与える影響を明確にする。さらに、SET7/9 のもつ “Trained immunity” と言われる免疫記憶を行うプロセスが腎線維化に与える影響を明らかにするとともに、そのメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

全身の Setd7-knockout (SET7/9^{KO}) マウスと Setd7-floxed (SET7/9^{f/f}) マウスは筑波大学生命科学動物資源センターに作製を依頼し、SET7/9^{f/f} マウスと LysM-Cre マウスと交配し LysM-Cre; SET7/9^{f/f} (MφSET7/9^{-/-}) マウスを作製した。腎虚血再灌流障害 (IRI) モデルは、片腎摘出され、8 日後に腎盂クランプによる片側虚血-再灌流が 30 分間行われ 5 日もしくは 4 週間後にサンプルを採取した。

4. 研究成果

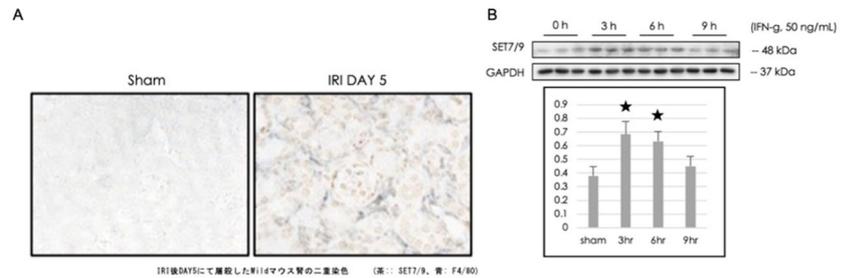
(1) 我々の研究グループは、UUO マウスモデルにおいて、SET7/9 は腎臓の尿細管上皮細胞と間質細胞 (線維芽細胞と免疫細胞) に発現しており、尿細管上皮細胞と線維芽細胞における SET7/9 の阻害効果については既に証明している (Sasaki K. *J Am Soc Nephrol* 2016)。腎虚血再灌流障害 (IRI) モデルの腎臓における SET7/9 の発現を確認するために、我々は、まず、IRI モデルの腎組織において SET7/9 の免疫染色をおこなった。SET7/9 の免疫染色では、IRI なし (Day0) では SET7/9 の発現はほぼ認めないが、IRI 後 Day1 では尿細管細胞を中心に SET7/9 の発現を認めた。さらに Day3 では SET7/9 の発現は増強したが、その



発現部位は尿細管から間質へと強い局在が移動し、Day5そしてDay7ではSET7/9の発現はさらに増強し、その発現部位は間質領域が中心となっていた (Fig 1A)。つぎに IRI モデルの腎臓における SET7/9 の発現を定量的に評価するために、我々は WB 解析をおこなった。Set7/9 の IRI マウスの腎臓における蛋白発現は、同様に IRI 後 Day1,3 と増強し、Day5 でピークとなった後、day7 でやや減少した (Fig 1B)。

(2) IRI モデルの腎臓の間質における SET7/9 発現が免疫細胞かどうかを検証するために、我々は、次に IRI 腎における SET7/9 とマクロファージマーカーである F/80 を用いて二重免疫染色をおこなった。SET7/9 と F/80 の二重染色では、間質に存在する SET7/9 陽性細胞の多くが F4/80 陽性であることが明らかになった (Fig 2A)。そこで、SET7/9 のマクロファージにおける発現を確認するために、マクロファージの細胞株である RAW264.7 細胞を用いて、我々は、RAW264.7 細胞を IFN 刺激し

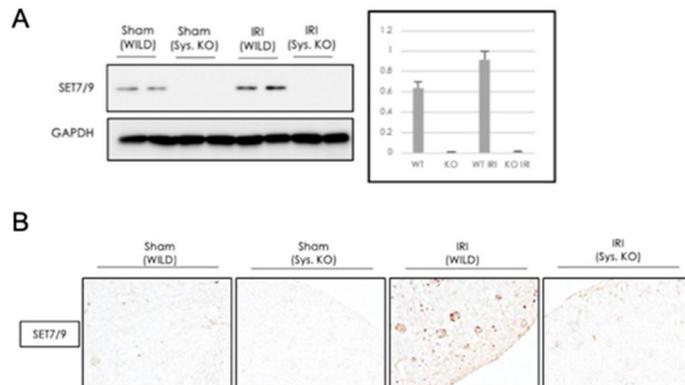
SET7/9 の発現を WB で評価した。IFN 刺激した RAW264.7 細胞では、刺激後 3 時間でその発現が増強し、6 時間、9 時間となるごとに徐々に発現が低下していった (Fig 2B)。



(3) 次に、我々は CRISPR-Cas9 による全身の SET7/9 のノックアウトマウスを作成し、SET7/9 の腎障害における影響を検討した。SET7/9 遺伝子がノックアウトされていることを確認するために耳組織を用いてジェノタイピングをおこなったところ、全身の SET7/9 のノックアウトマウスでは設計通り遺伝子欠損マウスが作成できていることが確認できた。次に、このマウスにおける平常時と腎障害時における SET7/9 の蛋白発現を評価するために、IR 障害前そして IRI 後 Day5 の腎臓をもちいて SET7/9 の蛋白発現を WB により評価した。腎臓における WB では、SET7/9 の蛋白発現は Fig1B と同様に sham と比較して IRI 後 Day 5 で発現が増強しており、SET7/9 ノックアウトマウスでは SET7/9 の発現は確認できないほどかなり減少していた (Fig 3A)。このノックアウトマウスの腎組織における

SET7/9 発現を確認するために、我々は、IRI 腎において SET7/9 の免疫染色をおこなった。SET7/9 の免疫染色では、WB の結果と同様に、WT マウスでは SET7/9 の蛋白発現は Fig1B と同様に sham と比較して IRI 後 Day 5 で発現が増強していたが、SET7/9 ノックアウトマウスでは SET7/9 の発現は大きく減少していた (Fig 3B)。

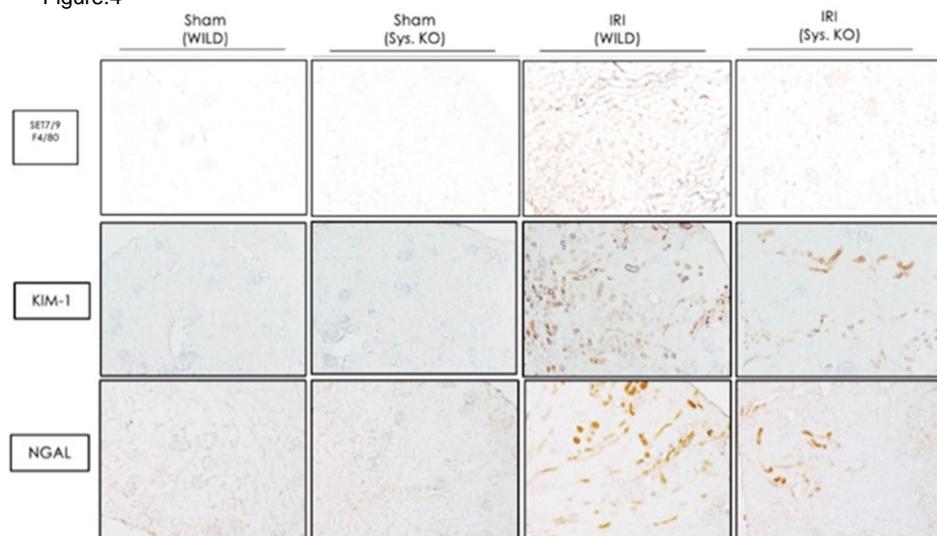
Figure.3



(4) 全身の SET7/9 のノックアウトマウスが予定通り作製できたことが確認できたため、次に我々は間質における SET7/9 の発現が最も大きかった IRI 後 Day 5 のモデルにおける腎障害の程度を評価した。SET7/9 と F/80 を用いて二重免疫染色では、WT では Fig 2A の結果と同様に間質に存在する SET7/9 と F4/80 ダブル陽性の細胞が多く発現していたが、SET7/9 のノックアウトマウスでは SET7/9 と F4/80 ダブル陽性の細胞は激減しており、さらに SET7/9 の発現は低下していたが、同時に F4/80 陽性細胞も減少していた (Fig 4)。全身の SET7/9 のノックアウトマウスの IRI 後 Day 5 モデルにおける腎障害の程度を評価するために、腎障害マーカーである KIM-1 と NGAL の免疫染色を行なった。KIM-1 の免疫染色では、IRI なし (Day0) では WT、ノックアウト共に KIM-1 の発現はほぼ認めないが、IRI 後 Day5 の WT では尿細管に発現を認めたが、ノックアウトでは KIM-1 の発現は低下していた (Fig 4)。NGAL の免疫染色の結果も同様であった (Fig 4)。

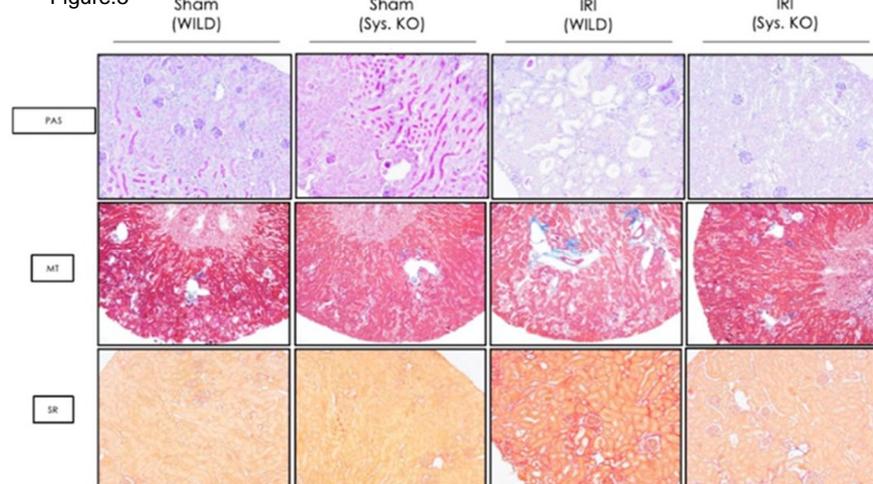
これらの結果より、全身の SET7/9 ノックアウトマウスでは IRI 後 Day5 での腎障害が軽減しており、マクロファージの浸潤も低下していたことがわかった。

Figure.4



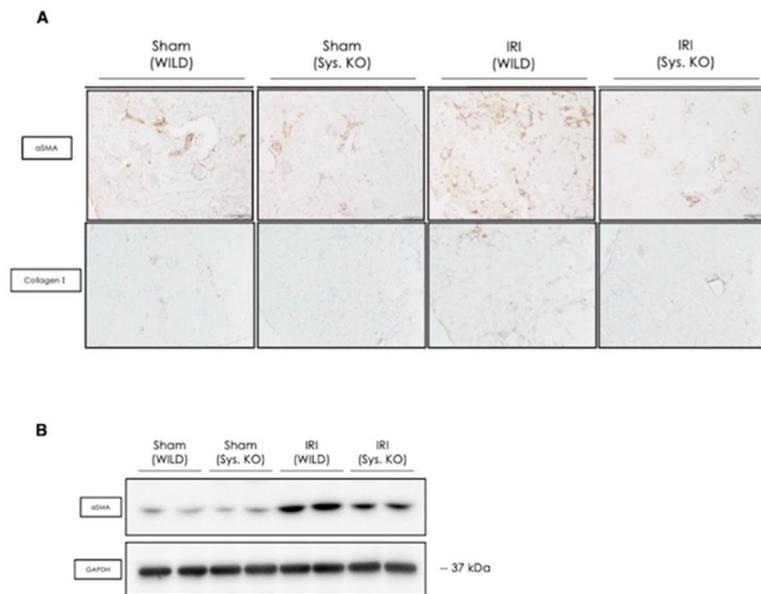
(5) 全身の SET7/9 ノックアウトマウスの腎組織の形態学的変化に対する影響を評価するために、IRI 後 Day 28 のモデルにおける腎組織の PAS 染色、Masson's trichrome 染色、Picro-Sirius Red 染色を行なった。このマウスの PAS 染色では、障害なしの状態では WT とノックアウトで差異を認めなかったが、IRI 後 Day 28 のモデルでは WT マウスで強い尿細管障害を認め、SET7/9 ノックアウトマウスでは尿細管障害度が軽度であった (Fig 5)。Masson's trichrome 染色と Picro-Sirius Red 染色でも、障害なしの状態では WT とノックアウトで差異を認めなかったが、IRI 後 Day 28 のモデルでは WT マウスで線維化組織の増加を認め、SET7/9 ノックアウトマウスでは線維化組織の割合が極軽度であった (Fig 5)。

Figure.5



(6) 次に、全身の SET7/9 ノックアウトマウスの腎線維化への影響を評価するために、筋繊維芽細胞マーカーである SMA と線維化マーカーである collagen 1 の免疫染色を行なった。このマウスの SMA 染色では、障害なしの状態では血管平滑筋が染まる程度で WT とノックアウトで差異を認めなかったが、IRI 後 Day 28 のモデルでは WT マウスで強い SMA 染色の増強を認め、SET7/9 ノックアウトマウスでは SMA 染色の程度が軽度であった(Fig 6A)。同様に、collagen 1 の免疫染色でも障害なしの状態では WT とノックアウトで差異を認めなかったが、IRI 後 Day 28 のモデルでは WT マウスで

Figure.6



強い collagen 1 染色の増強を認め、SET7/9 ノックアウトマウスでは collagen 1 染色の程度が軽度であった(Fig 6A)。さらに、全身の SET7/9 ノックアウトマウスの腎線維化への影響を定量的に評価するために、我々は WB 解析をおこなった。 SMA の蛋白発現は同様に障害なしの状態では WT とノックアウトで差異を認めなかったが、

IRI 後 Day 28 のモデルでは WT マウスで強い SMA 発現の増強を認め、SET7/9 ノックアウトマウスでは SMA 発現の程度が軽度であった。(Fig 6B)。

(7) 以上の結果より、我々の以前の報告(Sasaki K et al. JASN 2016)と同様に、全身の SET7/9 ノックアウトマウスでは腎障害後の腎線維化が抑制されていたが、この線維化抑制効果には骨髄由来免疫細胞における SET7/9 抑制が関与していることを示唆している。今後、我々は、腎組織から腎 M₁ や骨髄細胞を抽出し、mRNA やフローサイトメトリーを用いて M₁ の極性や性質変化を評価する。さらに、骨髄細胞の遊走能や貪食能も評価し、これらで ChIP assay を行うことで collagen 産生に与える影響を評価する。最後に、M₁ 特異的 SET7/9-KO の作製が完了したため、骨髄細胞由来の M₁ の SET7/9 が腎線維化に与える影響を評価すると共に、SET7/9 のもつ “Trained immunity” が腎線維化に与える影響を IRI 事前刺激モデルで明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------