

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890205

研究課題名（和文）糸球体上皮細胞における転写因子 KLF4 の役割の検討および蛋白尿治療への応用

研究課題名（英文）The role of Kruppel-like Factor 4 (KLF4) in glomerular podocytes and its application to the therapy of proteinuria.

研究代表者

林 香 (HAYASHI KAORI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60445294

研究成果の概要（和文）：転写因子 KLF4 は腎臓糸球体上皮細胞（ポドサイト）に発現しており、糸球体障害モデルでは発現が低下した。Tet-on システムを用いたポドサイト特異的 KLF4 トランスジェニックマウスや KLF4 発現プラスミド投与による遺伝子導入により、アドリアマイシン腎症モデルにおいて低下した KLF4 を再誘導すると、ポドサイトの形質が改善しアルブミン尿が減少した。更にその機序には KLF4 のポドサイト形質における Epigenetic 調節が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：KLF4 is expressed in kidney glomerular epithelial cells (podocytes), and its expression is decreased in proteinuric states. Transient restoration of decreased podocyte KLF4 by transgenic expression or gene transfer induced epithelial phenotype of podocytes and attenuated albuminuria. Moreover, it was suggested that KLF4 can modulate podocyte phenotype and function by epigenetic remodeling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：腎臓、高血圧

### 1. 研究開始当初の背景

（1）以前に我々はアンジオテンシン受容体拮抗薬（Angiotensin receptor blocker, ARB）を高用量一過性に投与することにより、糸球体硬化の一部退縮を起し得ることを報告した（Kidney Int. 78(1):69-78, 2010）。この時、興味深いことに、ARB の高用量投与を中止して 6 ヶ月以上経過した後にも、蛋白尿

の抑制効果は継続していた。

（2）そこで、尿蛋白において重要な役割を果たす糸球体上皮細胞（ポドサイト）に注目し、ARB を添加した際の遺伝子の発現変動についてマイクロアレイ解析で検討した結果、転写因子 KLF4 の変動に着目した。

（3）KLF4 は近年 iPS 細胞誘導の際に重要な 4 つの山中因子のうちの一つであり、これま

で上皮組織に発現が報告されているが、腎臓における発現や機能については不明であった。

## 2. 研究の目的

そこで本検討においては、腎臓における KLF4 の発現および機能について明らかにするとともに、蛋白尿改善効果の分子機序を解明し、蛋白尿治療への応用を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) KLF4 発現プラスミドの遺伝子導入、および Tet-on システムを用いたポドサイト特異的 KLF4 誘導トランスジェニック (Tg) マウス作成により In vivo での尿蛋白改善効果を検討する

(2) In vitro における KLF4 過剰発現によるポドサイト形質変化を検討する

## 4. 研究成果

(1) KLF4 は腎臓糸球体上皮細胞 (ポドサイト) に発現が認められ、糸球体障害モデル (アドリアマイシン腎症、PAN 腎症、糖尿病性腎症モデル) において発現が低下していた。

(2) 低下した KLF4 を再誘導した場合の変化を検討するため、KLF4 発現プラスミドの遺伝子導入、および Tet-on システムを用いたポドサイト特異的 KLF4 誘導トランスジェニック (Tg) マウスを用いて、アドリアマイシン腎症作成後に、ポドサイトに KLF4 を誘導すると、ポドサイトの上皮マーカー (ネフリン、ポドシン、シナプトポジン) 発現の改善、尿アルブミンの抑制が見られた。更に尿アルブミン改善効果は KLF4 誘導終了後も持続していた。

(3) In vitro においてポドサイトに KLF4 を過剰発現させると、形態が足突起を伸ばし

た arborized form に変化し、上皮マーカー遺伝子発現の上昇、間葉マーカー遺伝子の低下が認められた。また Tet-on システムでの KLF4 の一時的な誘導の際にも、この変化は持続していた。

(4) KLF4 による効果が In vitro, In vivo ともに持続していたことから KLF4 がポドサイトの形質に対してエピジェネティックな調節を行っている可能性を考え、網羅的 DNA メチル化解析を行ったところ、KLF4 過剰発現により上皮マーカー遺伝子のプロモーター領域は全体的に脱メチル化、間葉系マーカー遺伝子のプロモーターはメチル化されている傾向を認めた。

(5) そこで変化の大きかった上皮マーカー遺伝子としてネフリン、間葉系マーカーとしてビメンチンについて、MSP 法、BGS 法で詳細に解析を行ったところ、ネフリンプロモーター領域は KLF4 過剰発現によりメチル化されており、ビメンチンはメチル化されていた。さらに ChIP アッセイにより、ネフリンプロモーター領域は KLF4 過剰発現により H3K9 アセチル化の亢進、Dnmt1 結合の低下が認められた。

(6) 以上より、KLF4 は糸球体ポドサイトに発現し、その形質の調節に関与しており、その機序には遺伝子特異的な Epigenetic 調節が関与していることが示唆された。今後、背景で述べたアンジオテンシン抑制薬との関係について、更に検討を進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Kaori Hayashi, Hiroyuki Sasamura, Tatsuhiko Azegami, Hiroshi Itoh

Regression of atherosclerosis in apolipoprotein-E deficient mice is feasible using high-dose angiotensin receptor blocker, candesartan  
Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 2012;19 (8):736-46.  
PMID 22576470  
査読あり

② Tatsuhiko Azegami, Hiroyuki Sasamura, Kaori Hayashi, Hiroshi Itoh  
Vaccination against the angiotensin type I receptor for the prevention of L-NAME induced nephropathy  
Hypertension Research, 2012 May;35(5):492-9.  
PMID 22158111  
査読あり

③ Kaori Hayashi, Hiroyuki Sasamura, Takako Hishiki, Makoto Suematsu, Satsuki Ikeda, Tomoyoshi Soga, Hiroshi Itoh  
Use of serum and urine metabolome analysis for the detection of metabolic changes in patients with stage 1-2 chronic kidney disease  
Nephro-Urology Monthly 3: 164-171, 2011  
[http://numonthly.com/?page=article&article\\_id=1255](http://numonthly.com/?page=article&article_id=1255)  
査読あり

[学会発表] (計7件)

① 篠村裕之、林 香、畔上達彦、小口英世、中村真理、伊藤裕  
アンジオテンシン受容体拮抗薬高用量投与による動脈硬化退縮の検討  
第16回心血管内分泌学会総会、2012年11月

23日、東京

② Kaori Hayashi, Hiroyuki Sasamura, Tatsuhiko Azegami, Hideyo Oguchi, Mari Nakamura, Kimiko Ishiguro, Hiroshi Itoh.  
Regression of atherosclerosis in apolipoprotein-E deficient mice is feasible using high-dose angiotensin receptor blocker.  
International Society of Hypertension, Sydney, Australia, 2012.9.30-10.4

③ 林 香、篠村裕之、吉田理、中村真理、畔上達彦、小口英世、伊藤裕  
山中因子 KLF4 は腎糸球体上皮細胞に発現し、尿蛋白バリアの形成とアンジオテンシン受容体拮抗薬の抗蛋白尿作用に関与する  
第35回日本高血圧学会総会、2012年9月20日、名古屋 (トップ10演題選出)

④ 林 香、篠村裕之、吉田理、中村真理、畔上達彦、小口英世、伊藤裕  
山中因子 KLF4 は糸球体ポドサイトに発現し上皮形質維持に重要である  
第55回日本腎臓学会総会、2012年6月1日、横浜 (会長賞受賞)

⑤ 林 香、篠村裕之、畔上達彦、小口英世、中村真理、石黒喜美子、伊藤裕  
アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) 高用量投与による動脈硬化の退縮とその機序の検討  
第17回アンジオテンシンカンファレンス、2012年2月4日、大阪

⑥ 林 香、篠村裕之、畔上達彦、石黒喜美子、中村真理、伊藤裕  
アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) 高用

量投与による動脈硬化の退縮 (reversal) と  
機序の検討

第 34 回日本高血圧学会総会、2011 年 10 月  
22 日、宇都宮

⑦ 林 香、篠村裕之、畔上達彦、石黒喜美  
子、中村真理、伊藤 裕

ARB 高用量投与による自然発症高脂血症マウ  
ス (SHL) の糸球体病変退縮効果の検討

第 54 回日本腎臓学会総会、2011 年 6 月 16 日、  
横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 香 (HAYASHI KAORI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60445294