

令和元年6月13日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09618

研究課題名(和文) H3K27脱メチル化酵素JMJD3の阻害による腎虚血再灌流障害に伴う腎老化の制御

研究課題名(英文) Inhibition of JMJD3 attenuate renal senescence in ischemic reperfusion mice

研究代表者

土井 盛博(Doi, Shigehiro)

広島大学・病院(医)・病院助教

研究者番号：80626127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：腎虚血再灌流障害マウスにおけるMM-102の投与は、H3K4me3を低下させ、p16INK4a、炎症性サイトカイン、マクロファージ、腎線維化マーカーの発現を抑制した。さらに、腎線維芽細胞において、transforming growth factor (TGF)- β 1刺激によりH3K4ヒストンメチル化酵素、H3K4me3、p16INK4aの発現は亢進し、これらの発現は、MM-102の投与で低下した。また、chromatin immunoprecipitated assayにおいて、H3K4me3によって、p16INK4aの発現を制御していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、腎障害によって惹起されるMixed-lineage leukemia 1 (MLL1)とWD-40 repeat protein 5 (WDR5)の発現亢進によって、H3K4のトリメチル化が起こる結果、腎臓の老化が誘導され、腎における慢性炎症や線維化という病態をきたすことを証明された。この結果、なぜ慢性腎臓病(CKD)における臨床的、病理学的特徴は、加齢腎と一致するのかということが明らかにされた。さらに、CKDを治療する際には、老化に対しても介入しなければ、その進展を完全に抑制することはできないことも認識される。

研究成果の概要(英文)：MM-102 suppressed expression of p16INK4a and β -gal in ischemic reperfusion injury (IRI) mice, accompanied by decreased expression of Mixed-lineage leukemia 1 (MLL1) and WD-40 repeat protein 5 (WDR5) as well as H3K4me3. MM-102 also attenuated renal fibrosis and inflammation in the kidneys of IRI mice. In the in vitro study, transforming growth factor- β 1 induced expression of MLL1, WDR5, H3K4me3 and p16INK4a. Finally, the p16INK4a promoter was revealed to be an H3K4me3 site in renal fibroblasts. In conclusion, the MLL1/WDR5 inhibitor MM-102 ameliorates IRI-induced renal senescence together with renal fibrosis and inflammation through a reduction in H3K4me3.

研究分野：腎臓病

キーワード：MLL1 WDR5 H3K4me3 p16INK4a Senescence Acute kidney injury

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD) 患者の腎機能は加齢に伴って低下し、急性腎障害 (acute kidney injury: AKI) 発症や腎癌の発生リスクが高いことが報告されている。こういった臨床的な特徴は、高齢者と共通している。さらに、CKD に共通してみられる病理学的特徴も腎線維化であり、加齢腎と共通した組織像を示すことから、分子学的にも共通した機序が関与していることが示唆される。過去の研究において、われわれは、細胞周期の停止した細胞の蓄積が、老化と腎線維化を関連付ける因子であることを明らかにした。しかし、これまでの腎線維化モデルでの検討から、腎線維化を抑制しても、細胞周期の停止した細胞の蓄積は改善しないままであり、この点について介入しなければ、真の意味で CKD の進展を抑制する治療とはならないことが新たな課題となった。

腎線維化の過程において、transforming growth factor (TGF) - β 1 が重要な役割を示すことが知られているが、TGF- β 1 は免疫抑制作用を有しており、そのシグナル伝達経路の障害は、高度な炎症を惹起するため、臨床応用が困難である。これまでにわれわれは TGF- β 1 の刺激で、H3K9 と H3K4 メチル化酵素である G9a と SET7/9 の発現が亢進し、G9a が細胞性質の消失に、SET7/9 が細胞外マトリックスの産生に重要であることを明らかにした。一方で、抗炎症作用の発現には、TGF- β 1 の刺激で産生される Suv39h1 が関与していることが報告されている。このように、ヒストンメチル化は、特異的な酵素によって制御されおり、サイトカインの多様な作用を転写レベルで分離できるという点で、魅力的な治療ターゲットである。

細胞周期の停止には、低酸素や酸化ストレス、炎症など様々なストレスによって誘導される p16^{INK4a} が重要な役割を果たす。P16^{INK4a} の発現は、H3K27 のトリメチル化 (H3K27me3) を阻害するヒストン脱メチル化酵素である JMJD3 の発現によって調節されている。また、細胞周期の停止した細胞は、分泌細胞としての性質を獲得することが知られており、腎における p16^{INK4a} 陽性細胞の蓄積は、様々な液性因子を分泌することによって、慢性炎症と腎線維化に深く関与すると考えられる。さらに、炎症細胞における JMJD3 の発現は、M2 マクロファージの分化にも重要であることが知られている。このように、ストレスによって誘導される p16^{INK4a} の発現経路と役割を調査し、ヒストンメチル化酵素の阻害がこの治療ターゲットとなることを証明することが、CKD の進展抑制に不可欠であると考えられる。

2. 研究の目的

近年、腎臓における老化は加齢のみならず、様々なストレスや障害によっても引き起こされることが明らかになった。その分子学的な特徴は、細胞周期が停止した細胞 (p16^{INK4a} 陽性細胞) の蓄積であることが知られている。細胞周期の停止は生体防御反応としての側面を持つ一方で、細胞周期の停止した細胞は、senescence-associated secretory phenotype (SASP) という性質を示すため、その蓄積は慢性炎症を惹起する。一方、p16^{INK4a} の発現は、上述のように H3K27me3 によって負に制御されているが、H3K4 メチル化酵素である Mixed-lineage leukemia 1 (MLL1)/WD-40 repeat protein 5 (WDR5) の発現亢進を介した H3K4 トリメチル化 (H3K4me3) によっても正に制御を受けることが報告されている。本研究のプレリミナリーな検討において、確立された急性腎障害モデルである ischemic reperfusion injury (IRI) 後 7 日の時点で、p16^{INK4a} の発現は優位に上昇したが、当初の仮説に反して、p16^{INK4a} の発現を負に制御するはずの H3K27me3 の発現も上昇していた。このため、IRI 後の p16^{INK4a} の発現に H3K4me3 の方の関与が強いと考えて、MLL1/WDR5 阻害剤である MM-102 が IRI で誘導される腎老化を改善することを、マウスを用いた動物実験と腎線維芽細胞を用いた細胞実験にお

いて検討した。

3. 研究の方法

IRI マウスにおける MLL1、WDR5、H3K4me3、p16^{INK4a} の発現を確認する。同様の検討を、MLL1 と WDR5 の small interfering RNA (siRNA) を用いて、IRI で誘導される H3K4me3、p16^{INK4a} が、MLL1 や WDR5 に依存しているかを検討する。また、MM-102 を投与することで H3K4me3、p16^{INK4a} の低下を確認し、Senescence-associated β galactosidase (SA- β gal) にて老化の改善を検討する。また線維化もマーカーとして α smooth muscle actin (α SMA) とコラーゲンの発現を、炎症マーカーとして CD11b や Interleukin (IL)-1 β 、tumor necrosis factor (TNF)- α 、IL-6 の発現を検討する。細胞実験では、腎線維芽細胞を用いて、低酸素、過酸化酸素、TGF- β 1、TNF- α 、IL-6 中どの刺激にて MLL1、WDR5、H3K4me3、p16^{INK4a} が誘導されるかを確認する。また、同定された刺激によって上昇する H3K4me3、p16^{INK4a} の発現が、MM-102 を投与することで低下するかについて検討する。さらに、ChIP assay により、腎線維芽細胞での H3K4me3 領域において、p16^{INK4a} のプロモーターの発現が亢進することを明らかにし、MM-102 が p16^{INK4a} の発現を制御していることを証明する。

最後の上記の検討を、細胞周期の停止に関与している p53 と p21 の発現が、MM-102 の投与や MLL1 siRNA や WDR5 siRNA の投与によって変化しないことを明らかにする。

4. 研究成果

IRI マウスにおける MM-102 の投与は、MLL1、WDR5、H3K4me3 の発現を低下させ（上図）、p16^{INK4a}、SA- β gal、炎症性サイトカイン、CD11b、腎線維化マーカーの発現を抑制した。この効果は、IRI マウスにおいて、MLL1 siRNA や WDR5 siRNA を投与した場合においても同様であった。

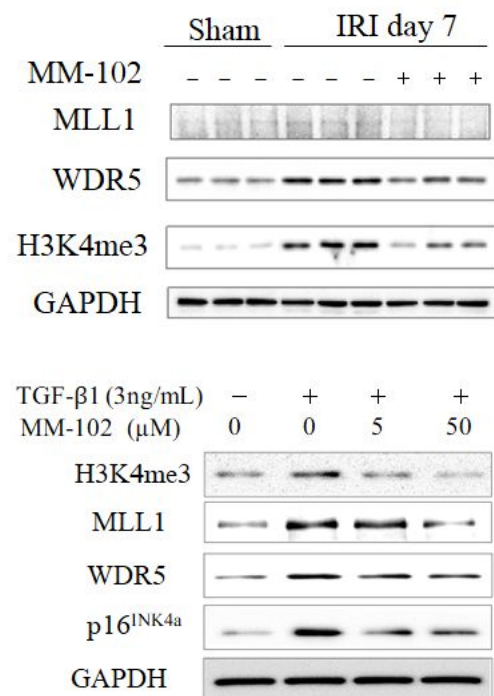
腎線維芽細胞において、TGF- β 1 刺激で MLL1、WDR5、H3K4me3、p16^{INK4a} の上昇を認めたが、低酸素、過酸化酸素、TNF- α 、IL-6 の刺激では認めなかった。TGF- β 1 刺激による H3K4me3、MLL1、WDR5、p16^{INK4a} の発現亢進は、MM-102 の投与で低下した（下図）。また、MM-102 は、TGF- β 1 で誘導される α SMA の発現も抑制した。

ChIP assay において、H3K4me3 抗体を用いて免疫沈降を行った領域において、p16^{INK4a} 遺伝子のプロモーターの発現が亢進しており、MM-102 の投与によって発現が低下することが明らかになった。

さらに、IRI マウスや TGF- β 1 刺激した腎線維芽細胞において、p21 と p53 の発現亢進を認めたが、これらは MM-102 では抑制されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)



〔学会発表〕(計 2 件)

Kidney Week 2018, San Diego, CA, USA

Hironori Shimoda, Shigehiro Doi, Ayumu Nakashima, Kensuke Sasaki, Toshiki Doi,
Takao Masaki

H3K4 Methyltransferase Inhibitor MM-102 Attenuates Renal Senescence in Ischemic
Reperfusion Mice Through Reduction of p16^{INK4a}

第 61 回日本腎臓学会学術集会・総会, 新潟, 2018

下田大紀, 土井盛博, 土井俊樹, 中島歩, 正木崇生

H3K4 メチル化酵素阻害剤 MM-102 は、p16^{INK4a} の発現を抑制し、腎の炎症と線維化を改善する

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 正木崇生

ローマ字氏名：MASAKI, Takao

所属研究機関名：広島大学

部局名：病院（医）

職名：教授

研究者番号（8桁）：30397913

研究分担者氏名：中島 歩

ローマ字氏名：NAKASHIMA, Ayumu

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究科（医）

職名：共同研究講座教授

研究者番号（8桁）：40448262

(2)研究協力者

研究協力者氏名：上野敏憲

ローマ字氏名：UENO, Toshinori

研究協力者氏名：佐々木健介

ローマ字氏名：SASAKI, Kensuke

研究協力者氏名：下田大紀

ローマ字氏名：SHIMODA, Hironori

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。