

平成30年6月12日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19489

研究課題名(和文) ヒストンバリエントH3.3をターゲットとした、腎線維化に対する治療方法の確立

研究課題名(英文) TGF-beta promotes expression of fibrosis-related genes through the induction of histone variant H3.3 and histone chaperone HIRA

研究代表者

佐々木 健介 (Kensuke, Sasaki)

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腎線維化はESKDに至る最終の共通経路である。腎線維化に深く関与するTGF- $\beta$ 1の阻害は高度の炎症を惹起するため、臨床応用は困難と考えられている。ヒストンバリエントH3.3は転写活性を促進させる遺伝子をマーキングする役割を担っており、それらをヒストンに組み込む特異的なヒストンシャペロンHIRAも明らかにされている。

本研究では、転写活性亢進のマークであるヒストンバリエントH3.3とそのヒストンシャペロンHIRAの腎線維化への関与を明らかにし、TGF- $\beta$ 1刺激で発現するHIRAを阻害することで腎線維化が改善することを証明した。

研究成果の概要(英文)：Renal fibrosis is a histological manifestation that occurs in almost every type of chronic kidney disease. Histone variant H3.3 and its chaperone, HIRA, serve as epigenetic marks that regulate transcriptional activity. In this study, we assessed the roles of histone H3.3 and HIRA in TGF- $\beta$ 1-induced renal fibrosis. In UUO mice, the levels of histone H3.3 and HIRA were upregulated in the kidneys via a Smad3-dependent pathway, and decreased by a TGF- $\beta$ 1 neutralizing antibody. Additionally, knockdown of HIRA decreased H3.3 and fibrogenesis. ChIP analysis revealed that promoters of fibrosis-related genes were immunoprecipitated with both HIRA and histone H3.3. Lastly, in human kidney biopsies, HIRA and H3.3 immunostaining correlated positively with areas of fibrosis. In conclusion, inhibition of the TGF- $\beta$ 1-induced histone chaperone, HIRA, via histone H3.3 induction, regulated the expression of fibrosis-related genes, and HIRA is a candidate therapeutic target for chronic kidney disease.

研究分野：慢性腎不全

キーワード：CKD ESKD 腎線維化 ヒストンバリエント H3.3 ヒストンシャペロン HIRA

### 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る。腎線維化で重要である TGF(Transforming Growth Factor)-1-Smad シグナルは、線維化作用に加え抗炎症作用も有していることが明らかになっている。長期にわたる TGF-1 の阻害は致死的な炎症を惹起するため、申請者らは、TGF-1-Smad シグナルの線維化作用のみを特異的に阻害する薬剤の開発を研究テーマとしている。

申請者らはこれまで遺伝子の転写活性の制御に注目しており、既知の抗真菌薬である Sinefungin は、H3K4 メチル化酵素 SET7/9 を阻害することで H3K4me1 の阻害を介し腎線維化を改善することを明らかにした(Sasaki K, et al. *J Am Soc Nephrol.* 2015)。加えて、同じく腎線維化に関与する H3K9 メチル化酵素 G9a を BIX01294 により阻害することで、H3K9me1 の阻害を介し Klotho の発現を保持し、腎線維化を改善することを明らかにした (Irifuku T, Sasaki K, et al. *Kidney Int.* 2015)。一方、TGF-1 の抗炎症作用には、H3K4me3 と H3K9me3 が重要であることが知られており、申請者らの報告は線維化作用のみを特異的に阻害する薬剤であると考えている。しかし、ヒストン修飾のみでは遺伝子発現の特異性を説明することはできず、より特異的に線維化に特化した治療ターゲットの解明が求められている。

最近の研究において、DNA のメチル化といった遺伝子発現を特異的に抑制する機構に加え、ヒストンバリエーションと呼ばれるヒストンの亜種が特定のゲノム領域に組み込まれることで、特定の領域での遺伝子発現調節を行うことが報告された (Hake SB, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006)。さらに、それぞれのヒストンのバリエーションを、ヒストンに組み込む特異的なヒストンシャペロンも発見されている。申請者らは、片側尿管結紮 (UUO) マウスを用いて検証的実験を行った結果、線維化した腎臓で、ヒストンバリエーションである H3.3 とその特異的ヒストンシャペロンである HIRA の発現上昇を確認している。以上より、腎線維化において発現亢進する H3.3 とそのシャペロン HIRA は、線維化に関与する遺伝子の転写活性を制御する重要な治療ターゲットであることが示唆される。さらに本研究では、ヒストンバリエーションの組み込まれた遺伝子領域に、線維化に関連した遺伝子が存在することも証明する。

### 2. 研究の目的

本研究では、転写活性亢進のマークであるヒストンバリエーション H3.3 とそのヒストンシャペロン HIRA の腎線維化への関与を明らかにし、HIRA 阻害剤の投与により腎線維化が改善することを証明する。まず、TGF-1 により

Smad3 経路を介して、ヒストンバリエーション H3.3 やヒストンシャペロン HIRA が発現することを示す。次に、ヒストンシャペロン HIRA はヒストンバリエーション H3.3 の発現や TGF-1 により発現する線維化蛋白である  $\alpha$ -SMA の発現に関与することを示す。さらに、ChIP Assay を用いて、TGF-1 刺激は、ヒストンバリエーション H3.3 やヒストンシャペロン HIRA が結合する領域の線維化遺伝子のプロモーター発現を増加することを示す。最後に、ヒト腎組織におけるヒストンバリエーション H3.3 やヒストンシャペロン HIRA の発現は、IgA 腎症患者の腎生検組織の線維化の程度と相関関係にあることを示す。ヒストンバリエーションの制御は、腎線維化の新たな治療薬開発につながると思われる。

### 3. 研究の方法

当教室ですでに確立しているマウスモデルである片側尿管結紮 (UUO) 腎線維化モデルにおけるヒストンバリエーション H3.3 とそのヒストンシャペロン HIRA の亢進が与える影響について、生食投与モデルと比較し明らかにする。そして、UUO モデルにヒストンシャペロン HIRA の siRNA を投与し、線維化の程度を検討する。さらに、ヒストンシャペロン HIRA の siRNA の投与によって線維化が改善する機序について細胞実験により検討を行う。また、ヒトへの応用の可能性も検討するために、慢性糸球体腎炎患者の腎生検組織におけるヒストンバリエーション H3.3 とそのヒストンシャペロン HIRA の発現変化が、それぞれ、その腎線維化の程度と相関するかを評価する。

### 4. 研究成果

#### ヒストンバリエーション H3.3 とヒストンシャペロン HIRA は線維化モデルの腎臓において発現が増加する

腎線維化におけるヒストンバリエーション H3.3 とヒストンシャペロン HIRA の役割を評価するために、まず、UUO マウスにおけるヒストンバリエーション H3.3 とヒストンシャペロン HIRA の遺伝子発現と蛋白発現を調べた。UUO マウスの腎臓では、ヒストンバリエーション H3.3 とヒストンシャペロン HIRA の遺伝子発現と蛋白発現はそれぞれ明らかに増加していた (図 1)。

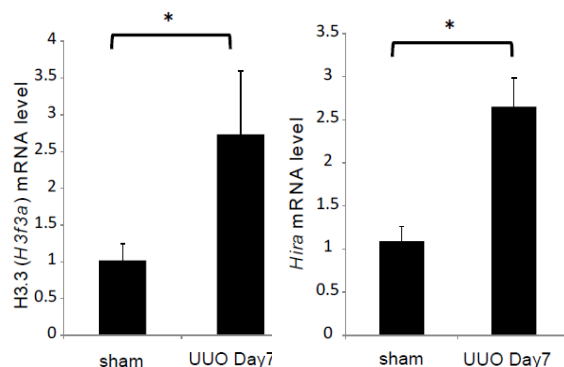


図 1

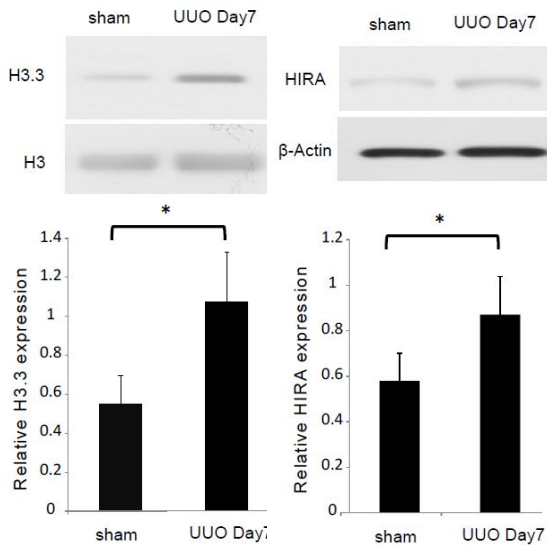


図 1

**ヒストンバリエント H3.3 とヒストンシャペロン HIRA の発現は、TGF- $\beta$ 1 により正方向に制御されている**

TGF- $\beta$ 1 は、腎線維化における重要な因子であるため、ヒストンバリエント H3.3 とヒストンシャペロン HIRA の発現が TGF- $\beta$ 1 によりどのように制御されているか調べた。腎線維化モデルの腎臓において上昇したこれらヒストンバリエント H3.3 とヒストンシャペロン HIRA の遺伝子発現と蛋白発現は、TGF- $\beta$ 1 中和抗体の投与で低下した (図 2)。腎細胞においても、同様の結果が得られた。さらに、TGF- $\beta$ 1 の濃度が 1.0ng/mL 以上、刺激時間は 6 時間以上でヒストンバリエント H3.3 とヒストンシャペロン HIRA の蛋白発現は増加していた (図 2)。

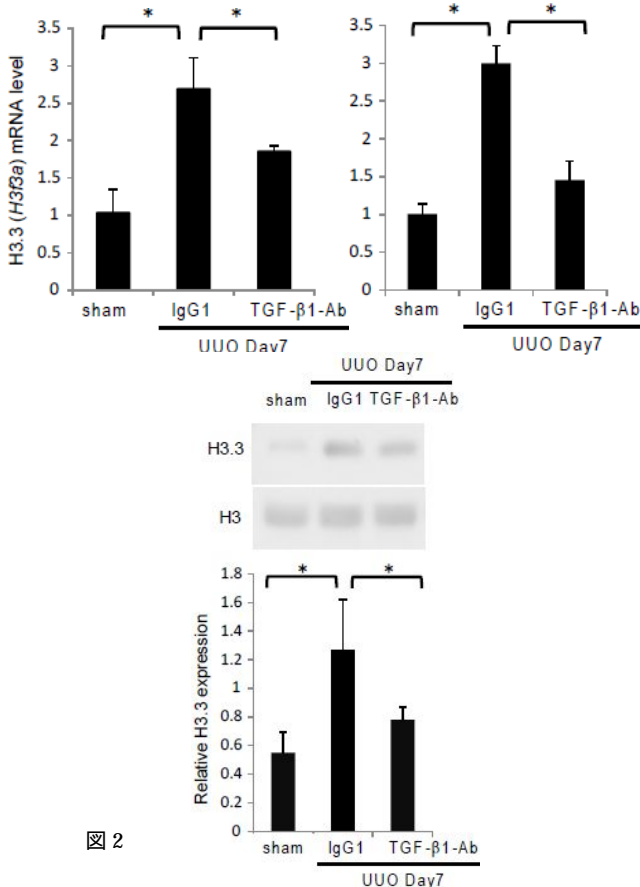


図 2

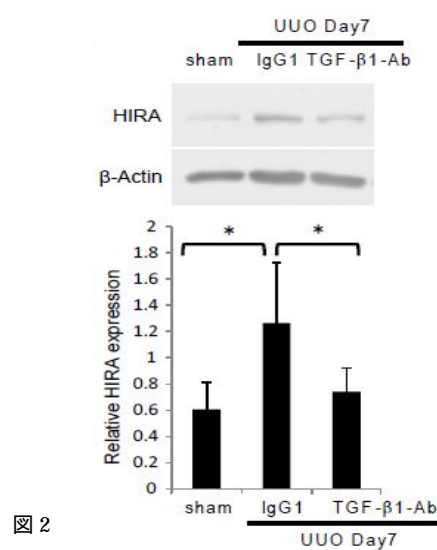


図 2

**TGF- $\beta$ 1 は、Smad3 を介してヒストンバリエント H3.3 とヒストンシャペロン HIRA を発現する**

TGF- $\beta$ 1 は Smad3 を含む多くのパスウェイを活性化することで腎線維化を引き起こす。TGF- $\beta$ 1 による Smad3 のリン酸化がヒストンバリエント H3.3 とヒストンシャペロン HIRA の制御に関与しているかどうかを調べるために、Smad3-siRNA (si-Smad) を腎尿細管細胞に導入した。Smad3-siRNA 導入により、ヒストンバリエント H3.3 とヒストンシャペロン HIRA の発現は低下した (図 3)。

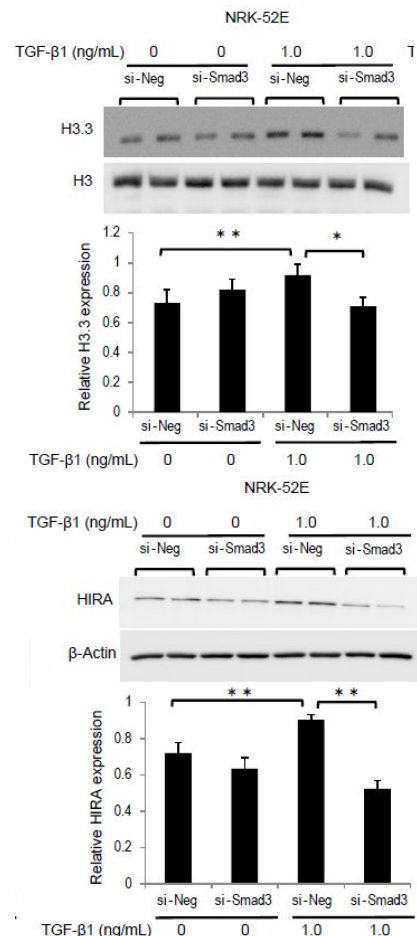


図 3

## ヒストンシャペロン HIRA のノックダウンはヒストンバリエント H3.3 を低下し腎線維化を抑制する

さらに、HIRA が腎線維化に重要かどうか確認するために、siRNA を用いて HIRA をノックダウンした。HIRA のノックダウンにより H3.3 の発現は低下し、TGF- $\beta$  1 刺激による腎尿細管上皮細胞の線維化マーカー発現も低下した (図 4)。

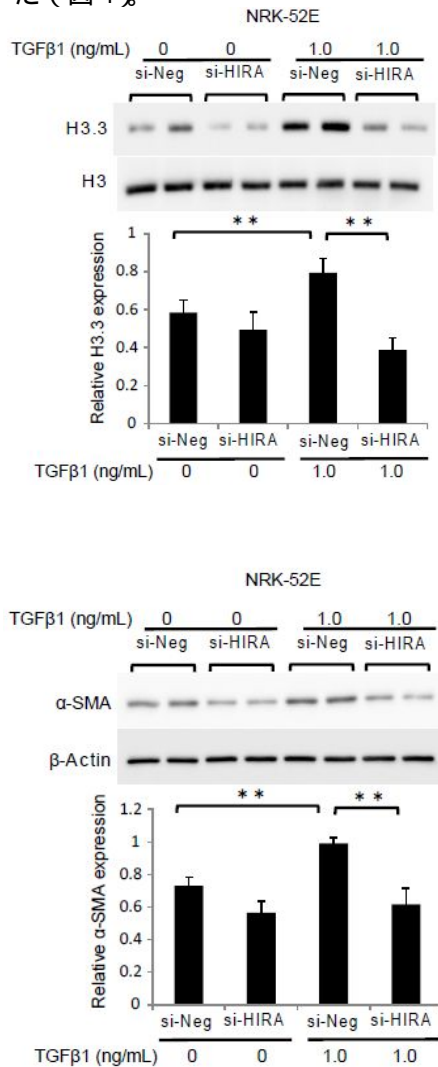


図 4

## TGF- $\beta$ 1 はヒストンバリエント H3.3 とヒストンシャペロン HIRA の線維化遺伝子プロモータへの結合を制御する

さらに、TGF- $\beta$  1 がヒストンバリエント H3.3 とヒストンシャペロン HIRA の転写活性を変化させるかどうか確認するために、ChIP Assay をおこなった。TGF- $\beta$  1 はヒストンバリエント H3.3 とヒストンシャペロン HIRA の Col1a1、CTGF、PAI-1 プロモータへの結合を増加させ、TGF- $\beta$  1 中和抗体によりその結合は低下した。ChIP Assay により、H3.3 や HIRA が結合する領域に線維化遺伝子のプロモータが存在することを示した (図 5)。

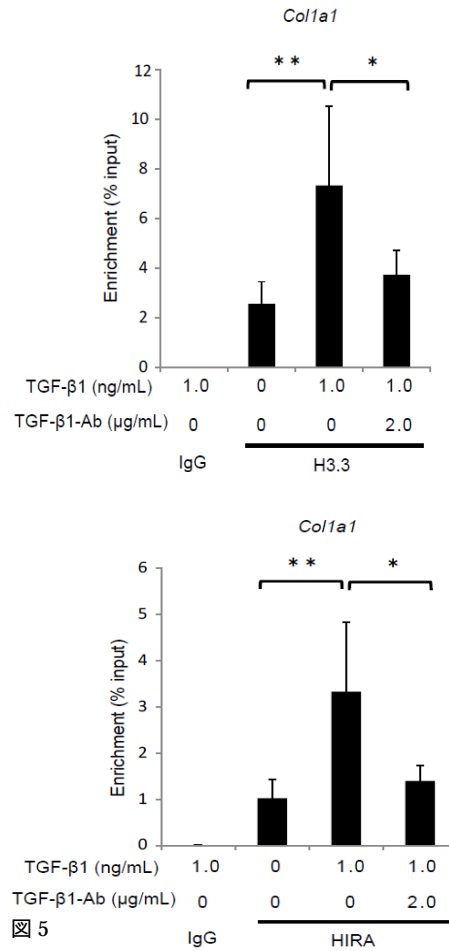
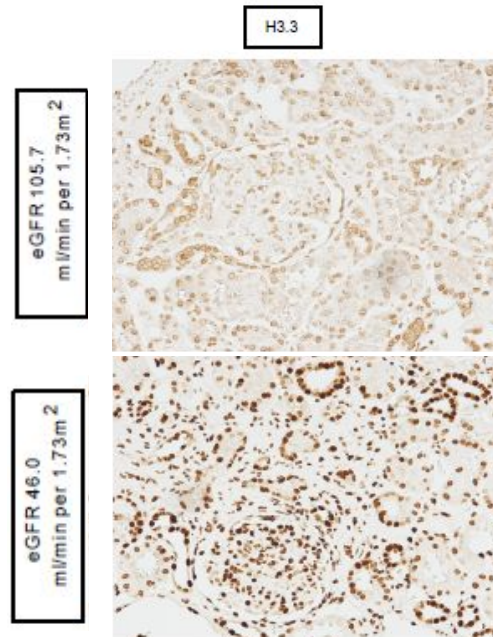
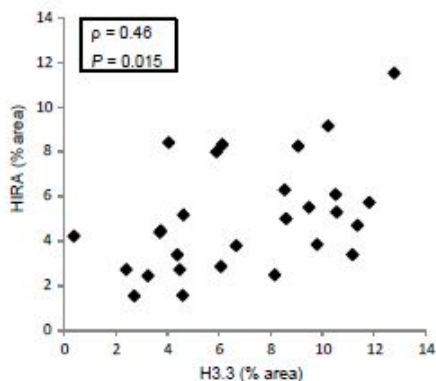
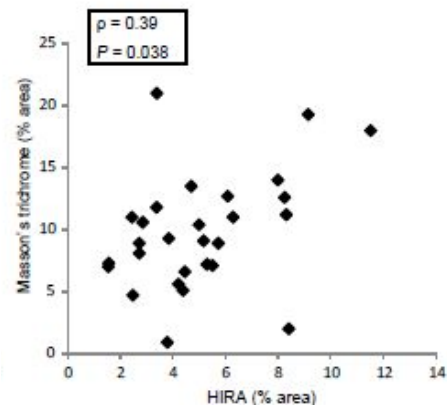
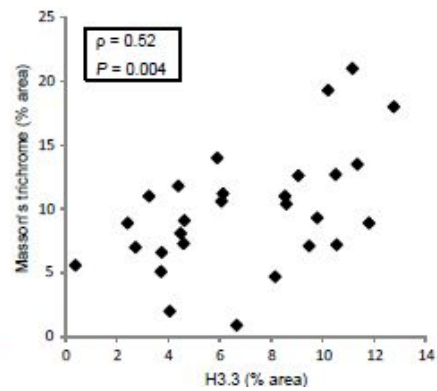
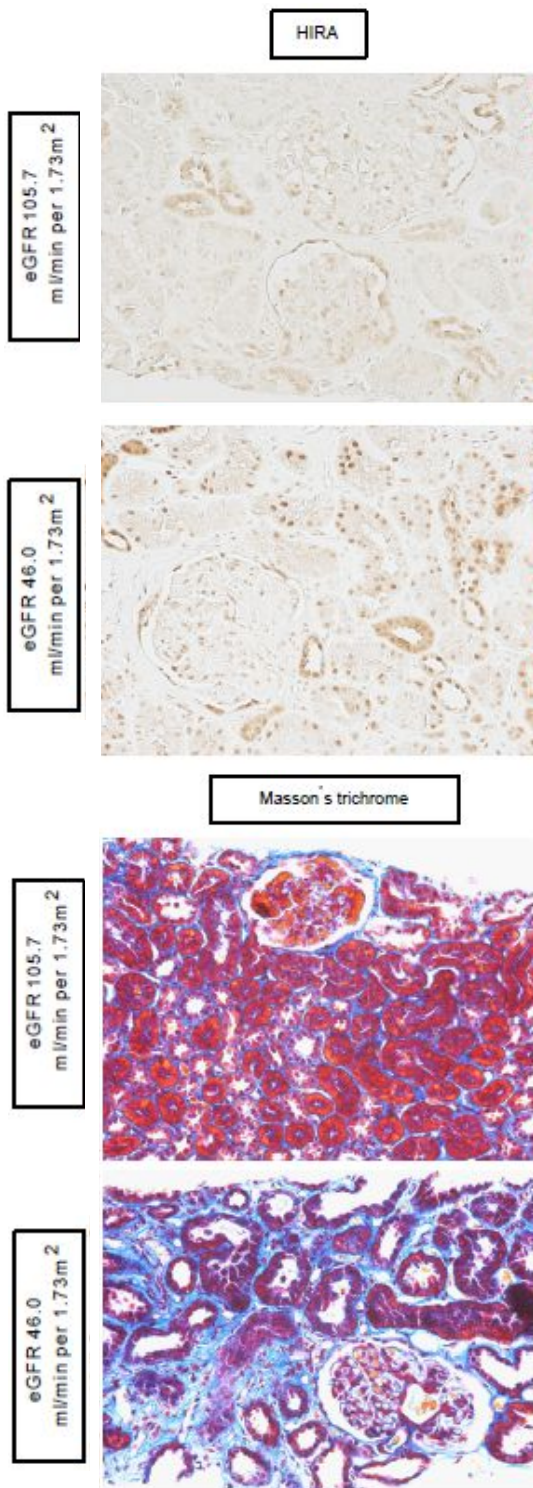


図 5

## ヒストンシャペロン HIRA の発現はヒストンバリエント H3.3 の発現の程度と腎線維化の程度とそれぞれ相関する

最後に、ヒストンバリエント H3.3 とヒストンシャペロン HIRA が腎線維化の程度と相関関係をもつことを調べるため、IgA 腎症と診断されたヒトの腎生検組織を用いて免疫染色を行った。その結果、ヒストンシャペロン HIRA とヒストンバリエント H3.3 の発現に正の相関関係を認め、Masson's trichrome の線維化の程度とヒストンバリエント H3.3 とヒストンシャペロン HIRA の発現の程度はそれぞれ正の相関関係を認めた (図 6)。





TGF- 1 により誘導されるヒストンシャペロン HIRA の阻害は、H3.3 を介して腎線維化を制御するため、HIRA は CKD 治療の新たな治療薬開発につながると考える。本研究は、現在、投稿中である。

#### 引用文献

Sasaki K, Doi S, Nakashima A, Irifuku T, Yamada K, Kokoroishi K, Ueno T, Doi T, Hida E, Arihiro K, Kohno N, Masaki T. J Am Soc Nephrol. 2016 Jan;27(1):203-15.

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Toshihiro Shindo, Shigehiro Doi, Kensuke Sasaki, Ayumu Nakashima, Takao Masaki, TGF- 1 promotes fibrotic gene expression though the induction of histone variant. 米国腎臓学会, 2017 年.

Toshihiro Shindo, Shigehiro Doi, Kensuke Sasaki, Ayumu Nakashima, Takao Masaki, TGF- 1 promotes fibrotic gene

expression though the induction of histone variant. ISN frontier, 2017年.

同研究講座教授  
研究者番号：40448262

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://jinzounaika.hiroshima-u.ac.jp/research/publication\\_list.html](http://jinzounaika.hiroshima-u.ac.jp/research/publication_list.html)

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：

### (4) 研究協力者

正木 崇生 (MASAKI, Takao)  
広島大学・病院(医)・教授  
研究者番号：30397913

土井 盛博 (DOI, Shigehiro)  
広島大学・病院(医)・助教  
研究者番号：80626127

中島 歩 (NAKASHIMA, Ayumu)  
広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・共