

令和元年6月19日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19496

研究課題名(和文)ポドサイトにおけるアンジオテンシン阻害薬によるエピゲノム修復効果の検討

研究課題名(英文)Epigenetic regulation through angiotensin blockade in podocytes

研究代表者

林 香 (Hayashi, Kaori)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：60445294

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)：最近申請者は腎系球体ポドサイトにおけるKLF4を介したエピゲノム調節とレニンアンジオテンシン阻害薬の持続的蛋白尿抑制効果との関連性について報告した(JCI2014, KI 2015)が本研究ではエピゲノム変化形成にDNA損傷修復が関与する可能性を見出した。本研究の結果、ポドサイトにおけるヒストンアセチル化酵素KAT5を介したDNA修復の生理的重要性が示唆され、糖尿病性腎症ではKAT5発現低下、DNA損傷増加を認めた。またKAT5発現によりスリット膜分子として重要なネフリンのプロモーター領域DNAメチル化低下と同領域での二本鎖DNA損傷マーカー H2AX低下を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、エピゲノム変化と様々な疾患の関連が報告されており、慢性腎臓病との関連も多数報告されている。申請者はこれまで慢性腎臓病病態におけるエピゲノム変化の関連について特に糸球体ポドサイトに注目して検討してきたが、エピゲノム変化形成プロセスは不明な点が多かった。本研究の結果KAT5を介したDNA修復がポドサイト維持に必須であり、糖尿病性腎症におけるDNAメチル化変化形成に関与している可能性が明らかとなった。本結果は、DNA損傷修復環境がエピゲノム変化形成に関与している可能性を示唆しており、腎臓のDNA損傷修復環境の制御因子が新たな腎臓病治療標的となる可能性があり学術的・社会的意義が大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Recently we have reported the association of KLF4-mediated epigenetic regulation in glomerular podocytes with sustained regression of proteinuria by renin-angiotensin system (RAS) inhibitors (JCI 2014, KI 2015). This study revealed that the epigenetic alteration in chronic kidney disease (CKD) was partly associated with impaired DNA damage repair in podocytes. Histone acetyltransferase KAT5 plays an essential role of DNA double strand break (DSB) repair in podocytes with physiological conditions, which is decreased in diabetic nephropathy. KAT5 expression caused decreased DNA methylation and decreased DNA DSBs in the same nephrin promoter region (Cell Rep 2019). This study indicates a novel concept that an environment of DNA damage repair, such as decreased KAT5 expression in diabetic podocytes, may cause altered DNA methylation. Further study is necessary to investigate the relationship between RAS activation and DNA damage repair.

研究分野：腎臓・高血圧

キーワード：慢性腎臓病 エピゲノム変化 DNA損傷修復 ポドサイト

1. 研究開始当初の背景

臨床的に、糖尿病、脂質異常症、高血圧など血管リスクに対する薬物介入試験において、治療による臓器環境の一過性の是正が、試験終了後も心血管イベントの発生に長く影響を残すことが経験され、「記憶(メモリー)効果」あるいは「遺産(レガシー)効果」と呼ばれている。これまで申請者らは、レニンアンジオテンシン系(RAS)抑制薬の高血圧や動脈硬化、慢性腎臓病(CKD)に対する持続的効果、すなわち「メモリー効果」について検討してきた(Ishiguro and Hayashi, et al. *Hypertension*. 2009, Hayashi, et al. *Kidney Int.* 2010, Hayashi, et al. *J Atheroscler Thromb.* 2012)。

CKDの尿蛋白に対して認められたRAS抑制薬による持続的効果の機序を検討する過程において、我々は尿蛋白バリアにおいて重要である糸球体上皮細胞(ポドサイト)に発現する転写因子Kruppel-like Factor 4 (KLF4)に着目し検討を行い、KLF4はポドサイト形質制御遺伝子をエピジェネティックな機序を介して調節していることが明らかとなった(Hayashi, et al. *J Clin Invest.* 2014)。更に、RAS阻害薬による尿蛋白抑制効果に一部KLF4を介したエピジェネティックな機序が関与していることを報告した(Hayashi, et al. *Kidney Int.* 2015)。しかしCKDにおいて、RASの亢進によるKLF4低下がどのようにしてDNAメチル化の変化に関与するのか、DNAメチル化等のエピゲノム変化は、KLF4低下以外にどのような機序で惹起されるのかについては、ほとんど不明であった。

2. 研究の目的

そこで本研究においては、腎糸球体ポドサイトにおいて、RASの亢進によるKLF4低下がどのようにしてDNAメチル化の変化に関与するのか、DNAメチル化等のエピゲノム変化は、KLF4低下以外にどのような機序で惹起されるのか、その分子機序を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

KLF4低下によるDNAメチル化亢進の機序を検討するため、KLF4と共役した働く因子として、ヒストンアセチル化酵素KAT5(Lysine acetyltransferase 5, Tip60)に着目した。KAT5はKLF4と共役して働くという報告があり(*Nucleic Acid Res.* 2007) DNMT1の分解に関与する可能性が示唆されていたこと(*Sci Signal.* 2010)からその関与について検討することとした。更にKAT5が二本鎖DNA損傷(DSB)修復に関与すること、既報でDSBによりDNAメチル化が惹起されることが報告されていた(*PLoS Genet.* 2007, 2008)ことから、ポドサイトにおけるKAT5を介したDNA損傷修復とエピゲノム変化について検討を進めた。

(1)ポドサイト特異的KAT5ノックアウトマウス(Podocin-Cre KAT5 fl/fl)およびタモキシフェン誘導型ポドサイト特異的KAT5ノックアウトマウス(Podocin-CreERT2 KAT5 fl/fl)を用いた検討

KAT5のポドサイトにおける生理的役割を検討するため、ポドサイト特異的KAT5ノックアウトマウスを作成した。また次に発生段階での関与を除外するため、タモキシフェン誘導型ポドサイト特異的KAT5ノックアウトマウスを作成した。更にヒト培養ポドサイトを用いたin vitroの検討を行った。

(2)ヒト糖尿病性腎症腎生検検体およびマウス糖尿病性腎症モデルを用いた検討

ヒト検体大規模データベース(<https://www.nephroseq.org/resource/login.html>)を用いて、各種腎炎で糸球体のKAT5発現の変動を調べた。またマウスモデルとしてSTZ誘発性糖尿病性腎症モデル、db/dbマウスモデルを用いて検討した。更にヒト培養ポドサイトを用いたin vitroの検討を行った。

4. 研究成果

作成したポドサイト特異的KAT5ノックアウト(KO)マウスは著明な尿蛋白、腎不全を呈し6週齢前後で死亡した。巣状糸球体硬化症(FSGS)の組織像、ポドサイト数減少、ポドサイトアポトーシス増加、ポドサイトDSB増加、DNAメチル化増加、ポドサイトマーカー発現低下を認めた。ポドサイトを単離してDNAメチル化に関与するDNAメチル化酵素(DNMT)およびDNA脱メチル化酵素の発現を検討すると、KOマウスではDNMT1およびDNMT3B発現が亢進していた。誘導型KOマウスにおいてもKAT5ノックダウン誘導4週間後から著明な蛋白尿を呈し、KAT5を介したDSB修復はポドサイト維持に必須であることが示唆された。またヒト培養ポドサイトでKAT5をノックダウンすると、DSBを示唆するH2AXの増加、染色体分析でDNA損傷増加、DNA

メチル化亢進を認めた。

データベース (Nephroseq) を用いた検索の結果、糖尿病性腎症で有意に KAT5 発現が低下しており、腎生検検体を用いた免疫蛍光染色により糖尿病性腎症における KAT5 発現低下が示唆された。また糖尿病性腎症マウスにおいてポドサイト KAT5 低下を認め、遺伝子導入により低下した KAT5 を補充すると尿アルブミン改善、ポドサイト DSB 改善を認めた。また in vitro の検討により (1) 高糖条件でポドサイト DSB は増加した (2) UV 照射によりポドサイト DSB および KAT5 発現は増加するが、高糖により惹起されたポドサイト DSB では KAT5 は増加せず有意な低下を認めた (3) ポドサイトにおいて重要なスリット膜分子であるネフリンのプロモーター領域の同一部位において、KAT5 発現により DSB 低下を示唆する H2AX の低下と DNMT1 および DNMT3B 結合の低下、DNA メチル化低下が認められた。

以上から、高糖は KAT5 発現を負に調節しており、ポドサイトにおいて高糖に伴う DNA 損傷増加と修復因子 KAT5 低下が、一部 DNA メチル化亢進によるポドサイト形質遺伝子発現の低下、ポドサイト形質の変化を介して糖尿病性腎症の病態に関与していることが示唆された。すなわち糖尿病性腎症においては KAT5 低下という DNA 損傷修復環境が DNA メチル化の変化を惹起している可能性が明らかになった。

本研究では当初、DNMT1 と KLF4 との関連性から KAT5 に着目したが、研究を進める中でポドサイトの DNA 損傷修復機構における重要性が新たに明らかとなった。そのため当初想定したレニンアンジオテンシン系との関連についての検討は、研究機関内に十分行うことができなかったが、アンジオテンシン II やアルドステロンは DNA 損傷を惹起することが報告されており、今後、RAS と DNA 損傷修復環境、エピゲノム変化との関連性についても検討を要すると考える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

(1) Akihito Hishikawa, **Kaori Hayashi***, Takaya Abe, Mari Kaneko, Hideki Yokoi, Tatsuhiko Azegami, Mari Nakamura, Norifumi Yoshimoto, Takeshi Kanda, Yusuke Sakamaki, Hiroshi Itoh (*corresponding author)

Decreased KAT5 expression impairs DNA repair and induces altered DNA methylation in kidney podocytes.

Cell Rep, 2019, 26: 1318-1332

査読あり

doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.005.

(2) Hiroshi Itoh, **Kaori Hayashi**, Kazutoshi Miyashita

Pre-emptive medicine of hypertension and its prospect

Hypertens Res. 2018, Mar;42(3):301-305

査読あり

doi: 10.1038/s41440-018-0177-3.

(3) Akihito Hishikawa, **Kaori Hayashi*** and Hiroshi Itoh (*corresponding author)

Transcription factors as therapeutic targets in chronic kidney disease

Molecules 2018, 23(5). pii: E1123

査読あり

doi: 10.3390/molecules23051123.

(4) Tatsuhiko Azegami, Yoshikazu Yuki, **Kaori Hayashi**, Akihito Hishikawa, Shin-ichi Sawada, Kazuya Ishige, Kazunari Akiyoshi, Hiroshi Kiyono, Hiroshi Itoh.

Intranasal vaccination against angiotensin II type 1 receptor and pneumococcal surface protein A attenuates hypertension and pneumococcal infection in rodents.

J Hypertens. 2018, 36 (2) 387-394

査読あり

doi: 10.1097/HJH.0000000000001519.

(5) Michiyo Takayama, Koichiro Azuma, **Kaori Hayashi**, Ryoko Shimizu-Hirota, Kanako Makino, Rieko Bessho, Toshifumi Yoshida, Kazuhiro Kashiwagi, Hiroshi Hirose, Nagamu Inoue, Yasushi Iwao

Relationship between sarcopenic obesity and metabolic syndrome among Japanese elderly who underwent a comprehensive health checkup

Japan Society of Health Evaluation and Promotion 2017, 44 (4) 587-593

査読あり

<https://jhep.jp/jhep/journal/journal04.jsp>

(6) **Kaori Hayashi***, Michiyo Takayama, Takeshi Kanda, Kazuhiro Kashiwagi, Akihito Hishikawa, Yasushi Iwao, and Hiroshi Itoh (*corresponding author)
Association of kidney dysfunction with asymptomatic cerebrovascular abnormalities in a Japanese population with health checkups
Circ J, 2017 Jul 25;81(8):1191-1197
査読あり
doi: 10.1253/circj.CJ-17-0140.

(7) **Kaori Hayashi***, Michiyo Takayama, Takayuki Abe, Takeshi Kanda, Hiroshi Hirose, Ryoko Shimizu-Hirota, Eisuke Shiomi, Yasushi Iwao, and Hiroshi Itoh (*corresponding author)
Investigation of metabolic factors associated with eGFR decline over one year in a Japanese population without CKD
J Atheroscler Thromb, 2017, 24(8):863-875
査読あり
doi: 10.5551/jat.38612.

(8) **林 香**. ポドサイトのエピゲノム調節機構と病態における役割. 医学のあゆみ、2017 年 10 月号、147-149
査読なし
<https://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/>

(9) **Kaori Hayashi**.
Editorial (Thematic issue: Epigenetic modulations in kidney podocytes: a possible target of treatment for proteinuria).
Curr Hypertens Rev. 2016; 12(2): 88
査読なし
<http://benthamscience.com>

(10) **Kaori Hayashi***, Akihito Hishikawa, and Hiroshi Itoh (*corresponding author)
DNA damage and epigenetic changes in kidney diseases - focused on transcription factors in podocytes.
Curr Hypertens Rev. 2016; 12(2): 105-11
査読あり
<http://benthamscience.com>

(11) **林 香**、伊藤 裕. 腎疾患とエピジェネティクス
アンチエイジング、抗加齢医学会雑誌、Vol. 12 No.6, 764-769、2016 年
査読なし
<https://www.anti-aging.gr.jp/>

〔学会発表〕(計 12 件)

(1) Hishikawa A, **Hayashi K**, Yoshimoto N, Itoh H.
Decreased KAT5 expression impairs DNA repair and induces DNA methylation in diabetic nephropathy podocytes.
2018.10.28, ASN kidney week 2018, Oral presentation

(2) Akihito Hishikawa, **Kaori Hayashi**, Hiroshi Itoh
KAT5 plays a key role in DNA damage repair and epigenetic regulation in kidney podocytes
APSH oral presentations, ISH, 22 September, 2018
(APSH First prize, ISH Best oral presentation award 受賞)

(3) 菱川彰人、**林 香**、中村真理、畔上達彦、吉本憲史、伊藤裕
DNA 修復因子 KAT5 はポドサイトの形質維持に必須であり、その低下が糖尿病性腎症の病態に
関与する
第 41 回日本高血圧学会総会、2018 年 9 月 14 日
(JSH/SHR 学会合同セッション最優秀賞受賞)

(4) 菱川彰人、**林 香**、中村真理、畔上達彦、吉本憲史、伊藤裕
DNA 修復因子 KAT5 はポドサイトの形質維持に必須である
第 61 回日本腎臓学会学術総会、2018 年 6 月 8 日

(5) 菱川彰人、林 香、中村真理、畔上達彦、吉本憲史、伊藤裕
腎糸球体ポドサイトにおける DNA 修復因子 KAT5 発現の低下は DNA 修復不全に関連したエピゲノム変化を惹起し、糖尿病性腎症の病態に關与する
第 22 回心血管内分泌代謝学会学術總會、2018 年 3 月 29 日
(YIA 受賞)

(6) Kaori Hayashi. Session: Podocyte replenishment and repair
Kruppel-like factor 4 and Epigenetic Phenotypic Podocyte Modulation
American Society of Nephrology, Kidney Week 2017, Invited speaker

(7) Akihito Hishikawa, Kaori Hayashi, Toshiaki Monkawa, Hiroshi Itoh
KAT5-mediated DNA damage repair is essential for the maintenance of podocytes
American Society of Nephrology, Kidney Week 2017

(8) Kaori Hayashi.
DNA damage response and epigenetic changes in ' cardiometabolic memory '
American Heart Association Council on Hypertension, 2017.9.14
Asian/ Pacific Hypertension Research Symposium, Invited speaker

(9) 菱川彰人、林 香、中村真理、畔上達彦、伊藤裕
Epigenetic modulation through histone acetyltransferase KAT5 in podocytes
第 60 回日本腎臟学会学術總會、2017 年 5 月 27 日
(総会長奨励賞受賞)

(10) 林 香、篠村裕之、伊藤裕
アンジオテンシン阻害薬のエピゲノム変化への修復効果
第 39 回日本高血圧学会總會、SHR 学会合同シンポジウム(新たな環境要因とエピゲノム)、2016 年 10 月 1 日 (招聘講演)

(11) 林 香、篠村裕之、伊藤裕
高血圧治療におけるレニンアンジオテンシン系抑制によるメモリー効果
第 39 回日本高血圧学会總會、シンポジウム (高血圧の先進治療)
2016 年 10 月 2 日 (招聘講演)

(12) Kaori Hayashi, et al.
Epigenetic change in glomerular podocytes of proteinuric CKD patients with angiotensin receptor blocker (ARB) treatment.
International Society of Hypertension, 2016.9.28

[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)研究協力者

研究協力者氏名：伊藤 裕

ローマ字氏名：ITO, Hiroshi

研究協力者氏名：菱川 彰人

ローマ字氏名：HISHIKAWA, Akihito

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。