

令和 4 年 4 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08688

研究課題名(和文)腎系球体ポドサイトにおけるDNA損傷およびエピゲノム変化と腎老化の関連

研究課題名(英文) Association of podocyte DNA damage and epigenetic alterations with renal aging

研究代表者

林 香 (Hayashi, Kaori)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：60445294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、ポドサイトにおけるDNA損傷がDNAメチル化などのエピゲノム変化を惹起し、持続的なポドサイト形質の変化がもたらされることにより、腎臓病病態に関与することが明らかになった。また、ヒトサンプルを用いた臨床研究の結果、ポドサイトDNA損傷の程度は、腎生検サンプルや尿中脱落細胞を用いて評価することが可能であり、ポドサイトDNA損傷やDNAメチル化変化は、蛋白尿や腎予後に関連する新規マーカーとして有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会を背景とした、高血圧や糖尿病増加に伴う慢性腎臓病(CKD)が増加していることから、老化に伴う変化を理解することは重要である。老化の本質として、DNA損傷やエピゲノム変化の蓄積が重要であることが知られており、本研究では腎臓の老化を理解するためにポドサイトDNA損傷や随伴するエピゲノム変化について検討した。その結果、ポドサイトDNA損傷は、老化のみならず多くのCKDに共通して認められる現象であり、新規治療標的、予後予測マーカーとして有用である可能性が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that podocyte DNA damage caused altered DNA methylation, which induced sustained changes in podocyte phenotypes and contributed pathogenesis of kidney diseases. Clinical studies suggested that podocyte DNA damage and DNA methylation, evaluated using renal biopsy samples or urine-derived cells, may be potential markers for predicting renal prognosis.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ポドサイト DNA損傷 エピゲノム DNAメチル化 老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人口の高齢化は我が国を始めとして多くの先進国の社会的問題となっているが、老化に伴う疾患の増加への対策は社会的・医学的急務であり、老化のメカニズムの正確な理解が必要不可欠である。DNA 損傷修復機構は生命維持に重要な機構の一つであるが、老化においては経年的な DNA 損傷の蓄積が重要な役割を果たしていると考えられている。更に、DNA 損傷修復には DNA の修復に加えてエピゲノム状態の修復も必要であり多くのエピゲノム修復因子が関与するが、十分な修復がなされなかった場合、エピゲノム修飾の変化 'epi-mutation' が残存する。DNA 損傷修復の繰り返しの中で、この epi-mutation が蓄積することが老化の表現型に関与する可能性が示唆されている (Nat Rev Mol Cell Biol, 2015)。これまで DNA メチル化を始めとするエピゲノム変化が老化に関連していることが報告されているが、DNA 損傷修復とエピゲノム変化蓄積のメカニズムに関しては、未だほとんど明らかになっていなかった。

一方、慢性腎臓病 (CKD) の増加は近年、日本のみならず世界的に問題となっており、背景として人口の高齢化に伴う糖尿病性腎症や高血圧性腎硬化症の増加が寄与しているとされる。健康な加齢であっても糸球体濾過量は年々低下することが知られているが、腎老化の分子基盤に関しては未だ不明な点が多い。我々はこれまで腎系球体上皮細胞 (ポドサイト) に注目した研究を行ってきたが、ポドサイトは基本的には分裂しない終末分化細胞であることから、ポドサイト形質変化や脱落が不可逆的な腎老化の中心の一端を担っている可能性が高い。

我々はこれまでポドサイトにおけるエピゲノム調節と CKD の関連について検討してきた (J Clin Invest 2014, Kidney Int 2015)。更に最近、糖尿病性腎症においてポドサイトの二本鎖 DNA 損傷 (DSB) 修復因子 KAT5 の発現低下が、ポドサイト形質遺伝子の DNA メチル化を介して病態に関与している可能性を見出した。そこで本研究では、ポドサイトの DSB 増加そのものが生体内で引き起こす病態を検討することにより、ポドサイト DNA 損傷と DNA メチル化を始めとしたエピゲノム制御との関連に着目して腎老化および腎老化をベースに発症する CKD の分子基盤を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究は、腎系球体ポドサイトにおける二本鎖 DNA 損傷に伴い惹起されるエピゲノム変化について、DNA メチル化を中心に検討し、腎老化との関連を明らかにすることを目的とする。ポドサイトは基本的に終末分化細胞であることから、DNA 損傷修復の特殊性・重要性が予想されるが、これまでほとんど報告されていなかった。本研究は、現在増加傾向にある CKD の背景にある腎老化のメカニズムに関して、申請者がこれまで行ってきたポドサイトにおける DNA 損傷とエピゲノム変化に注目して行うものである。動物モデルを用いた基礎検討に加えて、ヒトサンプルを用いた臨床検討を行うことにより、高齢化社会において近年増加し続ける CKD の治療法あるいは診断法開発に対する一つの新たなアプローチを見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、腎老化におけるポドサイトの二本鎖 DNA 損傷 (DSB) と DNA メチル化を始めとしたエピゲノム変化の役割、各種腎症におけるポドサイト DSB と DNA メチル化の意義、を明らかにする。そのために、(1) ポドサイト特異的 I-PpoI 過剰発現マウスを用いた検討、(2) ヒト腎生検検体を用いた検討を行う。

4. 研究成果

まず、ポドサイトにおける二本鎖 DNA 損傷と DNA メチル化との関連性についての検討を継続し、糖尿病性腎症においては、DNA 修復因子 KAT5 発現の低下と DNA 損傷惹起の増加、双方によりポドサイト DNA 損傷部位が増加し、DNA メチル化部位の増加、ポドサイト形質に重要な遺伝子発現の持続的低下を介して、病態に関与していることを明らかにした (Hishikawa, et al. *Cell Rep* 2019)。また DNA 修復因子の発現や役割は細胞特異性が高いことから、近位尿細管細胞における DNA 修復因子 KAT5 の役割についても検討を行った結果、近位尿細管細胞においては急性腎障害における DNA 修復と同時に、エピゲノム制御を介して糸球体濾過量調節にも関与していることが示された (Hishikawa, et al. *iScience* 2021)。

次に、純粋なポドサイトにおける DNA 損傷の反復が、腎老化にどのような影響を及ぼすのか、どのような表現型を呈するのかを明らかにするため、ホーミングエンドヌクレアーゼ I-PpoI をポドサイト特異的に発現させ、non-mutagenic に DNA 損傷を繰り返すマウスモデルを作成した。このマウスは、若年時には、加齢マウスに近い表現型を呈したが、その後急激に腎機能が増悪することが明らかになり、表現型の解析を継続することにより、ポドサイト DNA 損傷と DNA メチル化変化の新たな関連性が明らかにされつつある (Nakamichi, et al. ASN kidney week 2021, 日

本腎臓学会 2022 年発表予定)。当初は腎老化モデルと考えていたが、表現型として急激な腎機能増悪を認めたことや、並行して進めていたヒトサンプルを用いた検討の結果から、CKD 病態におけるポドサイト DNA 損傷の重要性が示唆されたため、腎老化にとどまらず、ポドサイト DNA 損傷を認めるすべての腎疾患に共通する final common pathway の理解につながる可能性がでてきており、現在引き続き解析を継続している。

また、腎生検サンプルを用いた検討により、各種腎症における DNA 損傷と DNA メチル化、および臨床パラメーター、腎予後との関連性が明らかになった。アジアで症例数が多く、最近ポドサイト障害が蛋白尿や予後と関連することが報告されている IgA 腎症症例における検討では、病理学的ポドサイトパッチとポドサイト DNA 損傷が関連しており、糸球体 DNA メチル化や二本鎖 DNA 損傷程度は、1 年間の eGFR slope に関連していることを報告した (Hayashi, et al. *Sci Rep* 2020)。また、光学顕微鏡所見では明らかに糸球体に変化を認めない、病理学的に Minor glomerular abnormalities (MGA) と診断された症例を用いた検討では、ポドサイト DNA 損傷程度と尿蛋白が関連しており、糸球体 DNA メチル化と eGFR slope が関連していることが示唆されている (Yoshimoto, et al. unpublished)。一方、公開データベースを用いた検討で、糸球体において DNA 修復因子の活性化が認められた膜性腎症においては、同程度の蛋白尿を呈する症例と比較しても、ポドサイト DNA 損傷との関連性は認められなかった。以上の結果から、各種腎症においてはポドサイト DNA 損傷の意義や病態における重要性が異なっていることが示唆され、また DNA メチル化という持続的な変化とも関連し、予後予測マーカーとして有用である可能性が示唆された。

さらに、腎生検は出血リスクを伴う侵襲的な検査であることから、非侵襲的に腎臓の DNA 損傷を評価する方法として、尿中脱落細胞に着目した。そして、尿中脱落細胞から、ポドサイト DNA 損傷程度を推定する方法について報告した (Hishikawa, et al. *Sci Rep* 2020)。この方法を用いて、高血圧単独の場合よりも、高血圧に糖尿病を合併した場合に、平均 eGFR が 60 前後と保たれている population であっても、ポドサイトの DNA 損傷が既に増加していることが示唆された。また、この方法を用いて腎臓 DNA 損傷を評価し、血液サンプルを用いた DNA メチル化プロファイルに基づいたエピゲノム年齢との比較を行うことにより、老化と腎臓 DNA 損傷との関連性について臨床研究を進めている (Hishikawa, et al. 2022 年日本腎臓学会発表予定)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Hayashi Kaori	4. 巻 26
2. 論文標題 Altered DNA methylation in kidney disease: useful markers and therapeutic targets	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 309 ~ 315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-022-02181-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hishikawa Akihito, Hayashi Kaori, Kubo Akiko, Miyashita Kazutoshi, Hashiguchi Akinori, Kinouchi Kenichiro, Yoshimoto Norifumi, Nakamichi Ran, Akashio Riki, Sugita Erina, Azegami Tatsuhiko, Monkawa Toshiaki, Suematsu Makoto, Itoh Hiroshi	4. 巻 24
2. 論文標題 DNA repair factor KAT5 prevents ischemic acute kidney injury through glomerular filtration regulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103436 ~ 103436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103436	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sugita Erina, Hayashi Kaori, Hishikawa Akihito, Itoh Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Epigenetic Alterations in Podocytes in Diabetic Nephropathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2021.759299	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Azegami Tatsuhiko, Nakayama Takashin, Hayashi Kaori, Hishikawa Akihito, Yoshimoto Norifumi, Nakamichi Ran, Itoh Hiroshi	4. 巻 70
2. 論文標題 Vaccination Against Receptor for Advanced Glycation End Products Attenuates the Progression of Diabetic Kidney Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 2147 ~ 2158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db20-1257	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ran Nakamichi, Kaori Hayashi, Hiroshi Itoh	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Effects of high glucose and lipotoxicity on diabetic podocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu13010241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hishikawa Akihito, Hayashi Kaori, Yoshimoto Norifumi, Nakamichi Ran, Homma Koichiro, Itoh Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 DNA damage and expression of DNA methylation modulators in urine-derived cells of patients with hypertension and diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-60420-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Kaori, Hishikawa Akihito, Hashiguchi Akinori, Azegami Tatsuhiko, Yoshimoto Norifumi, Nakamichi Ran, Tokuyama Hirobumi, Itoh Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Association of glomerular DNA damage and DNA methylation with one-year eGFR decline in IgA nephropathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-57140-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Kaori, Hishikawa Akihito, Itoh Hiroshi	4. 巻 50
2. 論文標題 DNA Damage Repair and DNA Methylation in the Kidney	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Nephrology	6. 最初と最後の頁 81 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000501356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hishikawa Akihito, Hayashi Kaori, Abe Takaya, Kaneko Mari, Yokoi Hideki, Azegami Tatsuhiko, Nakamura Mari, Yoshimoto Norifumi, Kanda Takeshi, Sakamaki Yusuke, Itoh Hiroshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Decreased KAT5 Expression Impairs DNA Repair and Induces Altered DNA Methylation in Kidney Podocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1318 ~ 1332.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.01.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計15件(うち招待講演 5件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Kaori Hayashi
2. 発表標題 DNA damage and DNA methylation in kidney diseases
3. 学会等名 EDTA-JSN Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ran Nakamichi, Akihito Hishikawa, Kaori Hayashi, Toshiaki Monkawa, Hiroshi Itoh
2. 発表標題 Continuous non-mutagenic DNA damage in podocytes activates inflammatory response and may accelerate kidney aging
3. 学会等名 ASN Kidney Week 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 香
2. 発表標題 DNA damage repair and altered epigenome in the kidney: as useful markers and therapeutic targets
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 香
2. 発表標題 糖尿病腎症とエピゲノム～ポドサイトにおけるKAT5発現とDNAメチレーション
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林 香
2. 発表標題 ポドサイトにおけるDNA損傷
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菱川彰人 林 香 他
2. 発表標題 AKIプレコンディショニング効果におけるDNA修復因子KAT5の役割の検討
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihito Hishikawa, Kaori Hayashi, et al.
2. 発表標題 DNA repair factor KAT5 acts against ischemia-reperfusion injury through promoted DNA repair and KCC3-dependent TGF regulation in proximal tubular cells
3. 学会等名 ASN Kidney Week 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihito Hishikawa, Kaori Hayashi, Hiroshi Itoh
2. 発表標題 Analysis of DNA repair factor KAT5 and DNA methylation modulators in urinary shedding cells of patients with diabetic kidney disease
3. 学会等名 ASN Kidney Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菱川彰人、林 香、中村真理、畔上達彦、吉本憲史、伊藤裕
2. 発表標題 DNA修復因子KAT5を介したエピゲノム調節機構はポドサイトの形質維持に必須であり、糖尿病性腎症新規治療標的となり得る
3. 学会等名 内分泌学会総会 (YIA受賞)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菱川彰人、林 香、中村真理、畔上達彦、吉本憲史、伊藤裕
2. 発表標題 腎系球体ポドサイトにおけるDNA修復因子KAT5の発現低下はDNAメチル化変化を惹起し、糖尿病性腎症の病態に関与する
3. 学会等名 抗加齢学会学術総会 (最優秀演題賞受賞)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 香、伊藤裕
2. 発表標題 エピゲノム変化と慢性腎臓病病態との関連
3. 学会等名 抗加齢学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菱川彰人、林 香、中村真理、畔上達彦、吉本憲史、伊藤裕
2. 発表標題 尿中DNA修復因子KAT5/podocinの糖尿病患者における検討
3. 学会等名 抗加齢学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菱川彰人、林 香、中村真理、畔上達彦、吉本憲史、伊藤裕
2. 発表標題 糖尿病患者尿中脱落細胞におけるDNA修復因子KAT5, エピゲノム修飾因子の解析
3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菱川彰人、林 香、畔上達彦、吉本憲史、伊藤裕
2. 発表標題 腎ポドサイトにおけるKAT5発現低下はDNA 修復不全およびDNA メチル化変化を惹起する
3. 学会等名 日本高血圧学会総会 (YIA受賞)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菱川彰人、林 香、畔上達彦、吉本憲史、伊藤裕
2. 発表標題 高血圧、糖尿病患者の尿中脱落細胞におけるDNA修復因子KAT5およびDNAメチル化修飾因子の解析
3. 学会等名 日本高血圧学会総会 (YIP受賞)
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------