

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860687

研究課題名(和文) 転写因子KLF4によるポドサイトのエピジェネティック調節機構の検討と治療への応用

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of podocyte phenotype through KLF4

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は本研究において、転写因子KLF4が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を報告した(Hayashi, et al. J Clin Invest. 2014)。更に、慢性腎臓病(CKD)において重要なレニンアンジオテンシン系(RAS)を阻害すること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)。以上の成果は、臨床的に汎用されているRAS阻害薬の新たな作用機序の存在を示唆しており、新たなCKD治療の開発につながる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have shown that transcription factor Kruppel-like factor 4 (KLF4) modulates podocyte epigenome and attenuates proteinuria (Hayashi, et al. J Clin Invest. 2014). Moreover, we demonstrated that renin-angiotensin system (RAS) blockade reset podocyte epigenome through KLF4 in part (Hayashi, et al. Kidney Int. 2015). These results provide a new concept that RAS blockade can exert therapeutic effects through epigenetic modulation of the kidney gene expression, and suggest a novel therapeutic approach for treatment of proteinuric kidney diseases.

研究分野：腎臓、高血圧

キーワード：慢性腎臓病 蛋白尿 ポドサイト エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

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)。このメモリー効果を担う機序として、高血圧発症・持続においては腎細動脈のリモデリングが関与しており、一過性の RAS 阻害が腎細動脈の構造変化として「記憶」され、持続的に血圧を抑制する現象を報告してきた。一方 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) に着目し検討を行った。その結果、KLF4 が慢性腎臓病の病態において重要である可能性が考えられ、エピジェネティック調節を介してポドサイトの形態と機能調節を行っている可能性が初めて示唆された。

2. 研究の目的

以上の結果を踏まえて、本研究においては、(1) KLF4 ポドサイト特異的ノックアウトマウスを作成し、腎臓における KLF4 の生理的役割を明らかにすること
(2) KLF4 によるエピジェネティックな遺伝子調節機構を検討し、ポドサイトの形質と機能調節を明確にすること
(3) KLF4 遺伝子導入による *insitu* での傷害ポドサイト再生療法を検討し、新たな蛋白尿治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) ポドサイト特異的 KLF4 ノックアウトマウス (K0) を作成し、腎臓におけるフェノタイプの解析を行った。尿アルブミン測定、腎臓 PAS 染色、蛍光免疫染色、RT-PCR、ウエスタンブロットにより、ポドサイト形質を制御する分子の発現を、野生型 (WT) と比較した。さらに K0 マウスにアドリアマイシン腎症を惹起した場合についても同様に、WT マウスと比較検討を行った。
- (2) KLF4 過剰発現ポドサイトを用いて網羅的 DNA メチル化解析を行い、コントロールポドサイトと比較した結果、遺伝子特異的なプロモーター領域のメチル化変化が認められたため、ポドサイトの上皮形質遺伝子としてネフリン、傷害時上昇する

間葉系遺伝子としてビメンチンの遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化、ヒストン修飾状態について検討した。

- (3) KLF4 発現プラスミドを尾静脈から急速静注して腎臓に導入するという既報の手法を用いて、KLF4 を腎臓に発現させることで、アドリアマイシン腎症、糖尿病性腎症などポドサイトで KLF4 発現低下が認められた腎症モデルにおいて、尿アルブミンや組織所見の改善効果が認められるか否かを検討した。

4. 研究成果

研究の主な成果

- (1) ポドサイト特異的 KLF4 ノックアウトマウスにおいては、WT と比較して明らかなフェノタイプの変化は認めなかったが、アドリアマイシン腎症を発症させると、WT に比して尿アルブミンの有意な上昇が認められた。ベースラインでフェノタイプの変化が認められなかった理由の一つとして、ポドサイトにおける KLF15 の発現が相補的に作用していることが示唆された。
- (2) KLF4 過剰発現により、ネフリンプロモーター領域の DNA メチル化は低下し、ビメンチンにおいては逆に上昇しており、遺伝子発現を調節している可能性が示唆された。さらにネフリンプロモーター領域では、KLF4 発現により DNA メチル化酵素である DNMT1 結合の低下、ヒストン H3K9 アセチル化の上昇が認められた。
- (3) KLF4 遺伝子導入により、アドリアマイシン腎症、糖尿病性腎症モデルにおいて尿アルブミンの有意な改善を認めた。

以上の本研究における成果、および本研究開始前の成果を合わせ、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を報告した (Hayashi, et al. *J Clin Invest.* 2014)。我々の検討において、KLF4 によるポドサイト遺伝子のエピジェネティックな変化は遺伝子特異的に認められた。このように、KLF4 により DNMT1 結合やヒストン修飾状態が遺伝子特異的に変化する詳細な分子機序については未だ明らかではないが、KLF4 の転写因子としての特性が重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

更に我々は、CKD 発症・進展において重要な役割を果たしているレニンアンジオテンシン系を阻害すること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, *Comments in Kidney Int.* 2015)。

以上から、転写因子 KLF4 を介した遺伝子

特異的なエピジェネティック調節機構が、ポドサイト形質を制御している可能性が示唆された。ポドサイトのエピゲノム調節に注目した研究は当研究室以外ではほとんどなく、更に、臨床的に高血圧や尿蛋白治療に汎用されているアンジオテンシン阻害薬の新たな作用機序の存在を示唆する結果であり、今後、新たなCKD治療の開発につながる可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Kaori Hayashi, Akihito Hishikawa, and Hiroshi Itoh

DNA damage and epigenetic changes in kidney diseases - focused on transcription factors in podocytes.

Curr Hypertens Rev. 2016 Mar 1 (epub ahead of print)

査読あり

<http://benthamscience.com>

2. Kaori Hayashi, Hiroshi Itoh *Therapeutic effect of RAS inhibitors on epigenetic changes in life-style related diseases*

Nihon Rinsho. 2015 Nov;73(11):1933-8.

査読なし

<http://www.nippon-rinsho.co.jp/>

3. Kaori Hayashi, Hiroyuki Sasamura, Mari Nakamura, Yusuke Sakamaki, Tatsuhiko Azegami, Hideyo Oguchi, Hirobumi Tokuyama, Shu Wakino, Koichi Hayashi, Hiroshi Itoh *Renin-angiotensin blockade resets podocyte epigenome through Kruppel-like Factor 4 and attenuates proteinuria*

Kidney Int. 88 (4): 745-53, 2015

査読あり

DOI: 10.1038/ki.2015.178.

4. Kaori Hayashi, Hiroshi Itoh *Transcription factors and epigenetic modulation - its therapeutic implication in chronic kidney disease (CKD)*

Arch Immunol Ther Exp. 63 (3): 193-196, 2015

査読あり

DOI: 10.1007/s00005-014-0326-6.

5. 林 香、伊藤 裕

ポドサイトにおけるエピジェネティック調節

腎と透析、2015年3月号、369-372

査読なし

<http://www.tokyo-igakusha.co.jp/>

6. Kaori Hayashi*, Hiroyuki Sasamura*, Mari Nakamura, Tatsuhiko Azegami, Hideyo Oguchi, Yusuke Sakamaki, Hiroshi Itoh (*corresponding author)

KLF4-dependent epigenetic remodeling modulates podocyte phenotype and attenuates proteinuria

J Clin Invest. 124 (6): 2523-2537, 2014
(Comments in *Nat Rev Nephrol.* 10(7): 362, 2014)

査読あり

DOI: 10.1172/JCI69557.

7. Hideyo Oguchi, Hiroyuki Sasamura, Kazunobu Shinoda, Shinya Morita, Hidaka Kono, Ken Nakagawa, Kimiko Ishiguro, Kaori Hayashi, Mari Nakamura, Tatsuhiko Azegami, Mototsugu Oya, Hiroshi Itoh.

Renal arteriolar injury by salt intake causes 'Salt Memory' for the development of hypertension.

Hypertension. 64(4): 784-791, 2014

査読あり

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02973.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 林 香

RAS抑制薬はKLF4を介してポドサイトのエピゲノムを調節する

第58回日本腎臓学会学術総会、2015年6月6日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

2. 林 香

アンジオテンシン拮抗薬による転写因子KLF4を介した糸球体ポドサイトのエピゲノム調節効果の検討

第88回日本内分泌学会学術総会、2015年4月24日、ホテルニューオータニ（東京都千代田区）

3. 林 香

KLF4とKLF15は相補的にポドサイト形質維持に関与する

第57回日本腎臓学会総会、2014年7月4日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

4. 林 香

山中因子KLF4による糸球体上皮細胞の上皮・間葉系マーカー遺伝子のエピジェネティック調節機構の検討

第51回分子臨床医学会学術総会、2014年4月11日、東京国際フォーラム（東京都千代

田区)

5. 林 香

山中因子 KLF4 は糸球体上皮細胞においてネフリン遺伝子プロモーターの選択的 DNA 脱メチル化を惹起し蛋白尿を抑制する

第56回日本腎臓学会総会、2013年5月12日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

〔図書〕(計 1 件)

1. 林 香、篠村裕之、伊藤裕

山中因子 KLF4 による糸球体上皮細胞遺伝子
のエピジェネティック調節

Annual Review 腎臓 2014 年、P117-122、中外
医学社

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

林 香 (Kaori Hayashi)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60445294

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし