

糖尿病性腎症における エピジェネティックメモリーの検討

林 香 菱川彰人 伊藤 裕

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科

key words : 糖尿病性腎症, DNA 損傷, エピゲノム, KAT5

要 旨

【目的】 我々は最近ポドサイト (Pod) におけるエピゲノム変化が慢性腎臓病の病態に関与している可能性を報告した。今回、エピゲノム変化の形成プロセスにおける DNA 損傷修復応答の関与に注目し、DNA 修復因子 KAT5 の役割を検討した。

【方法・結果】 Pod 特異的 KAT5 ノックアウト (KO) マウスを作製した結果、重症蛋白尿を伴う巣状分節性糸球体硬化症を呈し腎不全により 6 週齢前後で死亡した。KO では DNA 二本鎖損傷 (DSB) マーカー γ H2AX および DNA メチル化亢進、アポトーシス増加、ネフリン発現低下、ネフリンプロモーター領域 DNA メチル化亢進を示した。また Pod の KAT5 発現はマウス糖尿病性腎症において低下しており、KAT5 の遺伝子導入により表現型の改善を認めた。ヒト培養 Pod では高糖で KAT5 発現が低下し、KAT5 過剰発現によりネフリン発現改善、ネフリンプロモーター領域 DNA メチル化低下、DNMT 1,3B 結合低下および同領域における DSB 部位減少を示した。

【結論】 KAT5 を介した DNA 修復は Pod の形質維持に生理的に必須である。糖尿病性腎症では Pod での KAT5 低下が病態に関与しており、KAT5 を介した DNA 損傷修復がエピゲノム変化形成プロセスに関与している可能性が示唆され、新規治療標的になりうる可能性が示唆された。

1 目 的

糖尿病性腎症は日本における透析導入原疾患の第 1 位であり、維持透析患者の 3 分の 1 以上を占めることから、増加の一途をたどっている糖尿病性腎症の進展を予防することは喫緊の課題である。近年の大規模臨床試験において、発症早期の血糖値是正が将来の血管障害発症抑制に関係すること (メモリー効果, レガシー効果) が報告され、最近その機序としてエピゲノムの関与が示唆されている。

これまで申請者は、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、慢性腎臓病に対するメモリー効果について検討してきたが¹⁻³⁾、最近 RAS 阻害薬による尿蛋白持続抑制効果に一部 KLF4 を介したエピゲノム調節が関与していることを報告した^{4,5)}。しかしポドサイトにおけるエピゲノム変化形成プロセスに関してはほとんど不明である。そこで本研究においては、エピゲノム変化形成の原因のひとつとして DNA 損傷修復に着目し、二本鎖 DNA 損傷 (double strand breaks; DSBs) 修復において重要であり、また KLF4 interacting protein と報告されている⁶⁾ ヒストンアセチル化酵素 KAT5 に注目し、糖尿病性腎症ポドサイトにおけるエピジェネティックメモリーの形成機序を明らかにすることを目的とした。

Investigation of epigenetic memory in diabetic nephropathy

Division of Nephrology, Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine

Kaori Hayashi

Akihito Hishikawa

Hiroshi Itoh

2 方法

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製した。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製した⁷⁾。さらにヒト培養ポドサイトをを用いた *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

ヒト検体を用いた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。さらにヒト培養ポドサイトをを用いた *in vitro* の検討を行った。

3 結果

作製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 γ 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、②UV 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 γ 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。

4 考察・結論

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。この成果に基づき、根本的治療法のない糖尿病性腎症において、ポドサイトの KAT5 あるいは DNA 損傷修復環境の是正が、新規治療標的となり得る可能性が期待される。

平成 28 年度日本透析医会公募研究助成により得られた成果は、原著論文として Cell Reports に投稿したため、二重投稿となることを避け、本報告書ではその概要を総説的に記載した。なお、原著論文は 2019 年 1 月に下記論文として公表された。

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. 26, 1318-1332, 2019

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

文 献

- 1) Ishiguro K, Hayashi K, Sasamura H, et al. : "Pulse" treat-

- ment with high-dose angiotensin blocker reverses renal arteriolar hypertrophy and regresses hypertension. *Hypertension* 2009; 53(1) : 83-89.
- 2) Hayashi K, Sasamura H, Ishiguro K, et al. : Regression of glomerulosclerosis in response to transient treatment with angiotensin II blockers is attenuated by blockade of matrix metalloproteinase-2. *Kidney Int* 2010; 78(1) : 69-78.
 - 3) Hayashi K, Sasamura H, Azegami T, et al. : Regression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice is feasible using high-dose angiotensin receptor blocker, candesartan. *J Atheroscler Thromb* 2012; 19(8) : 736-746.
 - 4) Hayashi K, Sasamura H, Nakamura M, et al. : KLF4-dependent epigenetic remodeling modulates podocyte phenotypes and attenuates proteinuria. *J Clin Invest* 2014; 124(6) : 2523-2537.
 - 5) Hayashi K, Sasamura H, Nakamura M, et al. : Renin-angiotensin blockade resets podocyte epigenome through Kruppel-like Factor 4 and attenuates proteinuria. *Kidney Int* 2015; 88(4) : 745-753.
 - 6) Ai W, Zheng H, Yang X, et al. : Tip60 functions as a potential corepressor of KLF4 in regulation of HDC promoter activity. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(18) : 6137-6149.
 - 7) Yokoi H, Kasahara M, Mukoyama M, et al. : Podocyte-specific expression of tamoxifen-inducible Cre recombinase in mice. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25(7) : 2120-2124.