

# 山中因子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慢性腎臓病治療への応用

慶應義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝内科・予防医療センター  
助教 林 香

## はじめに

これまでに申請者らはアンジオテンシン受容体拮抗薬（ARB）を高用量で使用するにより、高血圧・動脈硬化・慢性腎臓病（CKD）の退縮（regression）が可能か検討してきた（Hypertension 2009, Kidney Int 2010, J Atheroscler Thromb 2012）。今回特にARBによるアルブミン尿の持続抑制の分子機序を検討するためマイクロアレイ比較解析を行った結果から転写因子Kruppel-like factor 4（KLF4）に着目した。転写因子KLF4はiPS細胞誘導の際に重要な「山中因子」の一つであり、これまで腎臓における発現や機能は不明であったが、これまでの申請者の検討では、以下のことが明らかとなった（2012年日本腎臓学会会長賞、2013年日本腎臓学会優秀演題賞受賞）。

- 1) KLF4はマウスおよびヒトの正常腎糸球体上皮細胞に発現し、蛋白尿を有するCKDモデル動物および慢性腎炎患者の糸球体においてKLF4の発現が著明に低下していた。
- 2) Tet-onシステムを用いてポドサイト特異的にKLF4を誘導するトランスジェニックマウスを作成し、アドリアマイシン（ADM）腎症発症後に一過性にKLF4を再誘導したところポドサイトの上皮マーカーの発現回復及び尿アルブミンの有意な改善を認めた。
- 3) KLF4をポドサイトに過剰発現させると上皮マーカーのプロモーター領域の広汎な脱メチル化、間葉マーカーのプロモーター領域の広汎なメチル化をもたらすことが示唆された。

これらの結果から、転写因子である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。そこでこれらの結果を踏まえて、本研究においては 1) *in vitro*, *in vivo*の系でKLF4ノックダウンによる効果を検討し、腎臓におけるKLF4の生理的役割を明らかにする、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、3) KLF4遺伝子導入による*in situ*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。

## 結 果

- 1) ヒト培養ポドサイトにおいてsiRNAを用いてKLF4をノックダウンした場合には有意なポドサイトの形態変化、上皮・間葉マーカー遺伝子発現の変化は認めなかったが、興味深いことに同じKLFファミリーに属するKLF15が上昇していた。KLF15は最近、ポドサイトの形質調節に関与していると報告されており（JBC, 2012）KLF15がKLF4と相補的に働いていると考えられた。一方アドリアマイシン（ADM）添加下では、KLF4、KLF15ともに低下しており、KLF4ノックダウンによりKLF4は更に低下し、ネフリンの発現の有意な低下が認められ、*in vitro*アルブミン透過性アッセイでアルブミン透過性が有意に亢進していた。またポドサイト特異的KLF4ノックアウト（KO）マウスを作成して行った解析においては、ベースラインでは形態・腎機能に差は認めなかったが、KOマウスではADM腎症が有意に増悪した。検討の結果、*in vitro*と同様にベースラインではKLF15が相補的に働いており、ADM腎症ではKLF15も低下するためにノックアウトマウスにおいては尿アルブミンの増悪が認められると考えられた。
- 2) KLF4のエピジェネティック調節が行われる機序としては、DNAメチル化酵素であるDnmt1のネフリンプロモーター領域への結合低下、ヒストンH3K9アセチル化亢進を介して、ネフリンプロモーター領域のDNA脱メチル化が起こることが、示唆された。
- 3) KLF4発現プラスミドを、ADM腎症モデル、糖尿病腎症モデル（db/db）に投与して尿アルブミンの改善を検討したところ、KLF4発現プラスミド投与群で、コントロールプラスミド投与群に比して有意な尿アルブミン改善効果が認められた。

## 考 察

以上の結果から、KLF4は腎糸球体上皮細胞（ポドサイト）に発現しており、エピジェネティックな機序を介してポドサイトの形質維持に関与している可能性が示唆された。今後、ポドサイトのエピゲノムが新たな蛋白尿治療のターゲットとなり得ることが期待される。

## 要 約

転写因子Kruppel-like factor 4（KLF4）は体細胞からiPS細胞を誘導する際に必要な山中因子の一つとして知られているが、今回我々はKLF4が腎糸球体ポドサイトに発現しており、蛋白尿を呈する糸球体疾患においてはKLF4発現が低下することをマウスのアドリアマイシン（ADM）腎症モデルやPAN腎症モデル、糖尿病腎症モデル（db/dbマウス）において明らかにした。更に、ヒト腎生検検体でも検討を行い、微小変化群や巣状糸球体硬化症、糖尿病性腎症において、動物モデルの結果と同様に、糸球体KLF4発現の低下を認めた。

このように糸球体疾患において低下しているKLF4を、ポドサイト特異的KLF4トランスジェニックマウスあるいはgene transfer法による遺伝子導入により再度誘導することにより、スリット膜蛋白であるネフリン発現の改善と尿アルブミンの持続的な回復を認めた。一方、ポドサイト特異的KLF4ノックアウトマウスを作成し解析を行った結果、basal stateでは有意な差は認められなかったが、ADM腎症における尿アルブミンはポドサイト特異的KLF4ノックアウトマウスにおいて著明に増悪を認めた。

次にヒト培養ポドサイトを用いたin vitroの検討を行った。ポドサイトにKLF4を過剰発現させると、ネフリンを始めとしたポドサイトの上皮形質マーカーの発現の上昇、間葉系形質マーカーの発現の低下を認めた。更にin vivoの検討において、ポドサイトにKLF4を誘導した効果がKLF4誘導中止後も持続していたことから、KLF4がポドサイト形質のエピジェネティックな調節を行っているという仮説を立て、ポドサイトの網羅的なメチル化解析を施行した。その結果、KLF4の発現によりポドサイトの上皮形質遺伝子のプロモーター領域は全体的に脱メチル化の傾向を認めたのに対して、間葉系形質遺伝子のプロモーター領域は全体的にメチル化の傾向を認め、バイサルファイトシーケンス法 (BGS法)、メチル化特異的PCR法 (MSP法) でも確認された。

以上から、転写因子KLF4はエピジェネティックな機序を介して、ポドサイト形質や機能を調節していることが明らかとなった。今後、ポドサイトのエピゲノム調節が、新たな蛋白尿治療のターゲットとなりうることが期待される。

以上の結果を下記文献1の通り報告し、謝辞に当助成に関して記載させて頂いた。

## 文 献

1. **Kaori Hayashi**, Hiroyuki Sasamura, Mari Nakamura, Tatsuhiko Azegami, Hideyo Oguchi, Yusuke Sakamaki, Hiroshi Itoh

*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)