

糖尿病性腎症のエピゲノム変化形成プロセスにおける DNA修復機構の役割の検討と治療への応用

慶應義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝内科

助教 林 香

(共同研究者)

慶應義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝内科 教授 伊藤 裕

慶應義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝内科

大学院生 (学術振興会特別研究員DC) 菱川 彰人

はじめに

慢性腎臓病 (CKD) 患者数は世界的に増加傾向にあり、有病率は10%を超え、その結果、年間約100万人の死亡原因となっている。その中でも最も増加が著しいのが糖尿病性腎症であるが、特に顕性腎症の段階に至るとレニンアンジオテンシン系 (RAS) 抑制薬以外に効果的な治療法がなく、増加の一途をたどっている糖尿病性腎症に対する新たな治療法の開発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 (DCCT/EDIC研究、UKPDS研究)、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、RAS抑制薬の生活習慣病におけるメモリー効果について検討してきた⁽¹⁻³⁾が、尿蛋白に対するRAS抑制薬の持続的効果の機序を検討する過程において、糸球体ポドサイトに発現する転写因子Kruppel-like Factor 4 (KLF4) に着目し、KLF4がポドサイトの遺伝子特異的なエピゲノム制御に関与しており、RAS阻害薬による尿蛋白抑制効果に一部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⁽⁴⁻⁸⁾。しかし、エピゲノム変化がどのように形成され疾患の発症・進行に関与しているのか、詳細な機序は不明である。

KAT5はMYSTファミリーに属するヒストンアセチル化酵素であるが、二本鎖DNA切断 (DSB) の修復において重要な役割を果たし、かつKLF4-interacting proteinであると報告されている。本研究ではポドサイトにおけるKAT5を介したDNA修復機構が、生理的に、あるいは病態においてどのような役割を果たすかについて検討を行った。

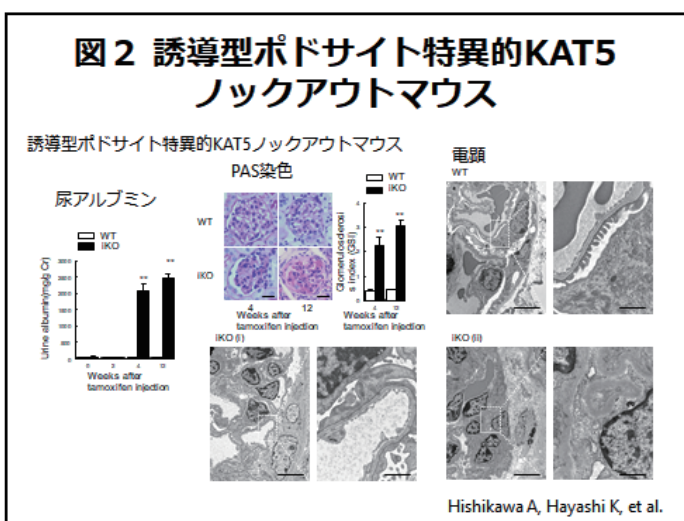
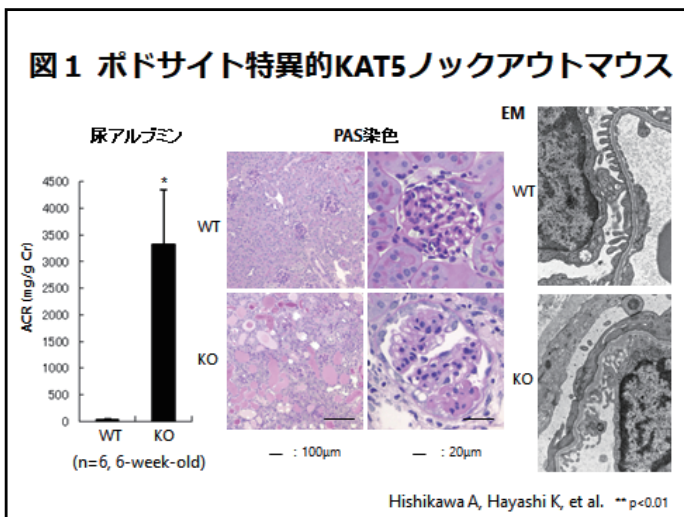
結 果

腎糸球体上皮細胞 (ポドサイト) にはKAT5が豊富に発現していた。まずポドサイトにおけるKAT5の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ところ、著明な尿アルブミン、分節性糸球体硬化、ネフローゼ症候群を呈し (図1)、

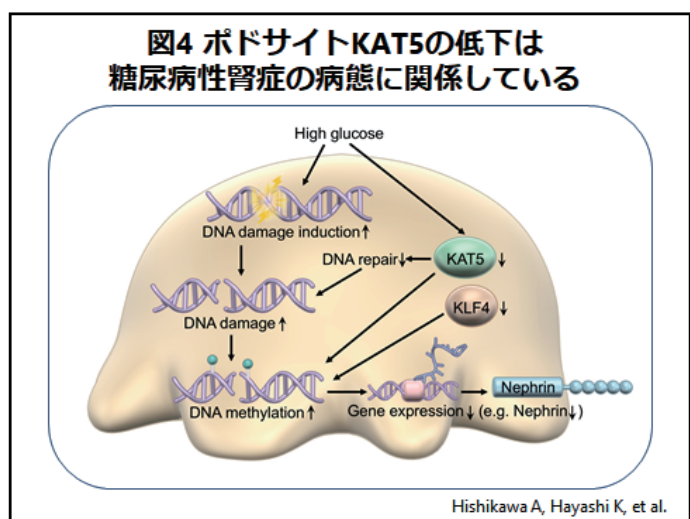
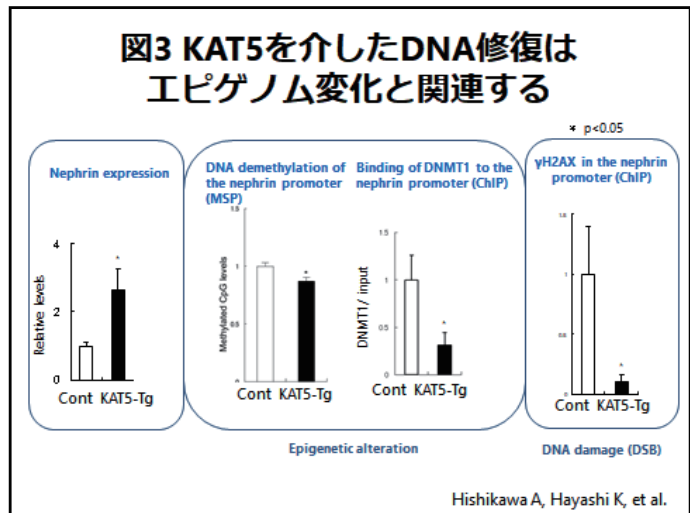
腎不全により6週齢前後で死亡するという激しい表現型を呈した。ポドサイトにおける二本鎖DNA損傷の増加、TUNEL陽性細胞数増加、ポドサイト数の減少、ポドサイト全体のDNAメチル化亢進、ポドサイト形質マーカーであるネフリン、ポドシン、ポドカリクシン発現の減少が認められ、ネフリンプロモーター遺伝子のDNAメチル化を認めた。

KAT5がポドサイト発生に関与している可能性を除外するため、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。このマウスでも、KAT5ノックダウン誘導後4週後より、ノックアウトマウスと同様の著名な尿アルブミン、分節性糸球体硬化を呈し（図2）、巣状糸球体硬化症（FSGS）の組織所見を呈した。これらの結果から、ポドサイトにおいてKAT5を介したDNA損傷修復が必須であることが示唆された。ヒト培養ポドサイトを用いたKAT5ノックダウンの検討においても同様の結果が示された。

次にポドサイトにおけるKAT5の病態における役割を検討するため、大規模データベースを用いてヒト糸球体におけるKAT5発現を検討した結果、糖尿病性腎症においてKAT5が著明に低下していることが明らかとなった。そこで、糖尿病性腎症モデルマウスを用いてポドサイトにおけるKAT5を介したDNA修復の重要性について検討することとした。STZ誘発性糖尿病性腎症マウスモデル、およびdb/dbマウスモデルにおいては、単離ポドサイトにおけるKAT5発現は低下しており、二本鎖DNA損傷マーカー γ H2AXの上昇、ネフリン発現低下が認められることが明らかとなった。更に、糖尿病性腎症において低下したKAT5を既報の遺伝子導入法により補充することにより、尿アルブミンの軽減、糸球体マトリクス増加の抑制が認められ、 γ H2AXの減少が認められた。ヒト培養ポドサイトにおいて、KAT5過剰発現により、DNAメチル化低下および γ H2AXの低下が同一ネフリンプロモーター領域で認められたことから、KAT5を介したDNA修復とDNAメチル化が関連している可能性が示唆された（図3）。



KAT5はDNA修復因子であり、UV照射等のDNA損傷により誘導されると報告されていることから、ポドサイトにUV照射を行い、DNA損傷を惹起したところKAT5発現上昇を認めた。興味深いことに、ポドサイトを高糖条件にした場合、同様にDNA損傷が惹起されたが、KAT5発現は低下していた。KAT5のプロモーター領域のルシフェラーゼアッセイを行ったところ、高糖条件によりプロモーター活性の低下が認められた。以上から、高糖によるポドサイトのDNA損傷増加に加えてKAT5低下によるDNA修復低下により、ポドサイトのDNA損傷増加、DNAメチル化増加を来し、ポドサイト障害を介して糖尿病性腎症の病態に関与している可能性が示唆された(図4)。



考 察

本研究においては以下の点が明らかとなった。

- (1) KAT5を介したDNA修復機構は、ポドサイト維持において重要である。
- (2) ポドサイトにおけるDNA修復の低下はDNAメチル化亢進を惹起しポドサイト障害に関与する。
- (3) 糖尿病性腎症ポドサイトにおいてKAT5発現は低下しており、低下したKAT5を補充することにより尿アルブミン、腎組織所見の改善が得られる。

本研究は、高血糖という代謝変容により惹起された、DNA修復因子KAT5の低下というDNA修復環境の変化が、DNAメチル化亢進というエピゲノム変化形成に関与している可能性を示唆したものであり、DNA損傷とエピゲノム変化の関連を、病態においてはじめて示唆した新規性の高い検討であると考えられる。当研究の成果に基づき、ポドサイトにおけるKAT5を始めとしたDNA修復経路が糖尿病性腎症の新規治療標的となり得るか、今後更なる検討が必要である。本研究内容は、第60回日本腎臓学会会長奨励賞、第22回心血管内分泌学会YIA、第44回日本高血圧学会JSH/SHR合同セッション最優秀賞、国際高血圧学会

APSH最優秀賞、国際高血圧学会 Best oral presentation award受賞（以上菱川先生発表）を受賞することができ、現在論文投稿中である。

要 約

KAT5はポドサイトの形質維持に必須であり、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た。また、糖尿病性腎症ポドサイトにおけるKAT5の低下は病態の進行において重要な役割を果たしており、新規治療標的になりうると考えられた。

貴重な研究助成を頂戴いたしまして、誠にありがとうございました。心より御礼申し上げます。

文 献

1. Hayashi K, Sasamura H, Ishiguro K, Sakamaki Y, Azegami T, Itoh H. 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.
2. Ishiguro K, Hayashi K, Sasamura H, Sakamaki Y, Itoh H. "Pulse" treatment with high-dose angiotensin blocker reverses renal arteriolar hypertrophy and regresses hypertension. *Hypertension.* 2009;53 (1) :83–9.
3. Hayashi K, Sasamura H, Azegami T, Itoh H. Regression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice is feasible using high-dose angiotensin receptor blocker, candesartan. *J Atheroscler Thromb.* 2012;19 (8) :736–46.
4. Hayashi K, Sasamura H, Nakamura M, Azegami T, Oguchi H, Sakamaki Y, et al. KLF4-dependent epigenetic remodeling modulates podocyte phenotypes and attenuates proteinuria. *J Clin Invest.* 2014;124 (6) :2523–37.
5. Hayashi K, Sasamura H, Nakamura M, Sakamaki Y, Azegami T, Oguchi H, et al. Renin-angiotensin blockade resets podocyte epigenome through Kruppel-like Factor 4 and attenuates proteinuria. *Kidney Int.* 2015;88 (4) :745–53.
6. Hishikawa A, Hayashi K, Itoh H. Transcription Factors as Therapeutic Targets in Chronic Kidney Disease. *Molecules.* 2018;23 (5) .
7. Hayashi K, Hishikawa A, Itoh H. DNA Damage and Epigenetic Changes in Kidney Diseases- Focused on Transcription Factors in Podocytes. *Curr Hypertens Rev.* 2016;12 (2) :105–11.
8. Hayashi K, Itoh H. Transcription factors and epigenetic modulation: its therapeutic implication in chronic kidney disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* . 2015;63 (3) :193–6.