

奨励金No.1556

急性腎障害から慢性腎臓病移行への エピジェネティックメモリーの病態解明

三村 維真理

東京大学医学部附属病院 腎臓・内分泌内科 特任講師

Breakthrough of epigenetic memory in AKI-to-CKD transition

Imari Mimura,

Division of Nephrology and Endocrinology, The University of Tokyo Graduate School of Medicine, Lecturer

申請者は急性虚血再灌流モデル（IR）マウスから尿細管細胞を単離してオープンクロマチン構造の網羅的解析（ATAC-seq）をおこなった。その結果、IR48 時間後の急性腎障害がピークのときにオープンクロマチンになり、6 週間後の腎線維化の病態においてもクロマチンがオープンに持続する領域を同定した。さらにその中で腎臓の線維化に関連する可能性のある遺伝群の近傍にみられたピークについて、遺伝子発現のエンハンサーのヒストンマークである H3K4me1, H3K27Ac 解析を行い、エンハンサー領域を同定した。

The applicant isolated tubular cells from an ischemia-reperfusion (IR) mouse model and performed a comprehensive analysis of open chromatin structure (ATAC-seq). We identified regions of open chromatin at the peak of acute kidney injury 48 hours after IR and persistent open chromatin in the pathogenesis of renal fibrosis 6 weeks later. The histone marks of gene expression enhancers, H3K4me1 and H3K27Ac, were analyzed to identify enhancer regions in the peaks near genetic groups that may be related to renal fibrosis.

1. 研究内容

慢性的に持続する腎障害・腎機能低下で定義される慢性腎臓病（CKD: chronic kidney disease）は、末期腎不全のみならず心血管疾患や死亡の独立した危険因子であり、全世界人口の 10% 以上を占める。その病理学的特徴は腎尿細管間質の線維化であるが（Nangaku M. J Am Soc Nephrol 2006）、腎線維化に対する有効な治療は存在せず、腎障害の進行は不可逆的である。一方、急性腎障害（AKI: acute kidney injury）は急性の腎機能低下で定義される病態で、虚血再灌流障害や敗血症、腎毒性物質への暴露などに伴って生じる。以前は回復後に影響を残さない一過性の病態と考えられていたが、近年の大規模な疫学研究や動物実験の結果から

AKI の既往とその後の CKD 進行への因果関係が示唆されている。この AKI-to-CKD transition の病態には、ネフロン喪失、尿細管修復異常、炎症、内皮細胞障害など様々なメカニズムの関与が示唆されており、基礎研究がおこなわれてきたが、その詳細なメカニズムは未だ完全に解明されていない。一方、遺伝子発現は DNA 塩基配列のみならず、DNA のメチル化やヒストン蛋白の様々な修飾、非翻訳 RNA、クロマチン構造の変化などにより複雑な制御を受けている。細胞はこれらエピゲノムの変化を“epigenetic memory”として保持することで遺伝子発現のパターンを記憶することができる。近年、発生分化の段階で獲得されるダイナミックなエピゲノム変化のみならず、分化後の細

胞が環境刺激によって獲得する epigenetic memory が様々な疾患に関与することが明らかとなり注目を集めている。AKI 刺激によるエピゲノム変化もその後の CKD 進展へ寄与すると考えられており、申請者はヒストン修飾阻害薬 DZNep がマウスモデルで腎線維化を抑制すること（Mimura I, et al. Sci Rep 2018）などを示してきた。DZNep を含め、腎線維化に有効なエピジェネティックな因子を標的とした薬剤は動物実験では複数報告されているが、薬剤の低い特異性や広い off-target 効果のため、腎疾患への臨床試験の段階には到達していない（Tanemoto F, Mimura I, et al. Pharmaceuticals (Basel) 2022）。詳細なメカニズムの解明に基づく特異性の高い介入法が求められている。

申請者は AKI が引き起こす epigenetic memory のメカニズムを解明し、CKD への移行を阻止する治療法を見つけるため、以下の実験を行った。急性虚血再灌流モデルは両側腎動脈クランプによる虚血再灌流障害（IRI: ischemia/reperfusion injury）を引き起こすモデルである。両側腎動脈を 18 分間の阻血時間の後に開放し、Sham・IRI 48 時後・IRI 6 週後の 3 群を作成した。腎機能（血清 Cre 値）は 48 時間後に急激に上昇し、6 週後はゆるやかに上昇した。6 週後の免疫染色で尿細管間質の線維化進行を確認した。さらに、申請者らのグループは、単細胞分離に必要な蛋白分解酵素として、好冷性微生物 *Bacillus Licheniformis* 由来の CAP（cold active protease）を用いた。低温でも活性が維持される CAP は通常の酵素反応に必要な 37℃での培養による細胞傷害を避けることができ、実際に Egr1（early growth response 1）や Fos などの超急性期細胞傷害マーカーの酵素処理過程での上昇を抑制することを確認している。CAP による酵素処理ののち、尿細管冊子縁に発現する糖蛋白である Prominin-1 に対する抗体を用いて、magnetic cell sorting（MACS）法で抽出した。上記の手法を用いてマウスから単離した抽出尿細管細胞分画が非尿細管分画と比較して、尿細管マーカーであ

る（Lrp2: LDL receptor related protein 2）が有意に上昇していること、および集合管／血管内皮／糸球体の各マーカー（Aqp2: aquaporin 2/Kdr: kinase insert domain receptor/Nphs1: nephrin）が有意に低下していることを確認した。

申請者らのグループは IRI マウスから上記の方法で尿細管細胞を単離し、オープンクロマチン構造の網羅的解析（ATAC-seq）をおこなった。ATAC-seq（assay for transposase-accessible chromatin with high-throughput sequencing）は、DNA を切断する transposase が物理的にオープンクロマチンにのみアクセスできることを利用して、DNA 断片を増幅してこの領域を同定する手法である。その結果、IR48 時間後の急性腎障害がピークの際にオープンクロマチンになり、6 週間後の腎線維化の病態においてもクロマチンがオープンのままである約 200 箇所領域を同定した。さらにその中で腎臓の線維化に関連する可能性のある遺伝子群の領域にみられたピークについてエンハンサーのヒストンマークである H3K4me1, H3K27Ac 解析を行い、エンハンサー領域であることを確認した。

2. 発表（研究成果の発表）

1. Saigusa H, Mimura I, Kurata Y, Tanaka T, Nangaku M. Hypoxia-inducible lnc RNA MIR210HG promotes HIF1 α expression by inhibiting miR-93-5p in renal tubular cells. FEBS J. Apr 8, 2023.
2. Mimura I, Miura R, Saigusa H, Yamazaki T, Tanemoto F, Kurata Y, Sato D, Tanaka T, Nangaku M. Chromatin remodeling factor, INO80, inhibits PMAIP1 in renal tubular cells via exchange of histone variant H2A.Z. for H2A. Sci Rep. 14;13(1):13235. 2023.
3. Yamazaki T, Mimura I, Kurata Y, Tanaka T, Nangaku M. Dznep, a histone modification inhibitor, inhibits HIF1 α binding to TIMP2 gene and suppresses TIMP2 expression under

- hypoxia. *Physiol Rep.* Sep;11(17): e15810. 2023.
4. Ogura Y, Mimura I. Epigenetic roles in clonal hematopoiesis and aging kidney-related chronic kidney. *Front. Cell Dev. Biol.* 11: 1281850, 2023.
 5. Ito M, Michelle Ducasa G, David Molina J, Varona Santos J, Kumar Mallela S, Ju Kim J, Mengyuan Ge, Mitrofanova A, Sloan A, Merscher S, Mimura I, Fornoni A. ABCA1 deficiency contributes to podocyte pyroptosis priming via the APE1/IRF1 axis in diabetic kidney disease. *Sci Rep.* 14; 13(1): 9616. 2023.
 6. Mimura I, Nangaku M. Epigenetic regulation of angiogenesis and ischemic response by long noncoding RNA LEENE in diabetes. *Kidney Int.* Jul 5: S0085-2538 (23)00483. 2023.

【学会発表】

2023 年

1. 日本腎臓学会総会シンポジウム（招待講演）パシフィコ横浜 2023 年 6 月 11 日 「長鎖非コード RNA、MIR210HG は AKI において miR-93-5p に競合的に結合し HIF1 α を安定化させる」
2. 日本透析学医学総会ワークショップ（招待講演）2023 年 6 月 18 日 「HIF-PHI 概論」
3. 日本透析学医学総会シンポジウム（招待講演）2023 年 6 月 18 日 「透析期における HIF-PH 阻害剤の課題と展望」
4. 日本腎臓学会西部学術集会シンポジウム（招待講演）2023 年 10 月 7 日 「腎線維化に寄与するエピジェネティックメモリーの分子機序解明」
5. 日本分子生物学会シンポジウム（招待講演）2023 年 12 月 6 日 「INO80, a chromatin remodeling factor, inhibits PMAIP1 by exchanging H2A. Z. and H2A in renal tubular cells.」