

食塩負荷高血圧による慢性腎不全抑制に寄与するエピジェネティック因子の解明

三村 維真理

東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科

概要

1. 研究目的と背景

塩分の過剰摂取は高血圧や交感神経活性化、血液凝固異常などを介して腎障害を悪化させ、慢性腎臓病 (CKD: chronic kidney disease) の進行因子となることが知られている。動物実験においても塩分負荷は血圧上昇や蛋白尿増加を通じて腎機能を悪化させることが示されており、CKD の進展機序と新規治療法の解明は喫緊の課題である。本研究では、急性腎障害 (AKI: acute kidney injury) から CKD へ移行する AKI-to-CKD transition モデルマウスを用い、エピジェネティックな分子機構に着目した新たな治療標的の探索を行った。

2. 研究方法

両側腎動脈 18 分間の虚血再灌流 (IR: ischemia reperfusion) による AKI モデルを作成し、48 時間後および 6 週間後にそれぞれ AKI と CKD を評価した。単離した尿細管細胞から RNA-seq と ATAC-seq を実施し、遺伝子発現とクロマチン状態の変化を解析した。さらに、ヒト近位尿細管上皮細胞 (RPTEC) に低酸素刺激を加え、HIF1 によるクロマチン変化を ChIP-qPCR で評価した。候補となったエンハンサー領域 (PTPN12-E) を CRISPR/Cas9 でノックアウトしたマウスを作成し、同様の IR モデルを適用した。

3. 研究結果

RNA-seq により、Sham, AKI (IR48 時間後), CKD (IR6 週間後) の各群で遺伝子発現のクラスター化が可能であり、AKI と CKD の両方で発現上昇する 133 の共通遺伝子を同定した。ATAC-seq では、AKI でオープンとなった後も CKD までオープンクロマチン領域が持続する 229 か所を検出し、その中でも PTPN12 遺伝子上流 91 kbp にある領域がエンハンサーとして機能している可能性が示唆された。RPTEC での ChIP-qPCR により、HIF1 のリクルートが低酸素後も持続することが確認された。また、PTPN12-E ノックアウトマウスでは CKD 病態が軽減される予備的結果が得られた。

4. 考察

本研究は、AKI によって誘導されたクロマチン構造の変化が CKD 進行にも関与する「低酸素メモリー (hypoxic memory)」の存在を示唆しており、特定のエンハンサー領域が CKD の持続的な病態形成に寄与している可能性がある。これらのエピジェネティック変化を標的とした新規治療法の開発が期待される。

1. 研究目的

塩分の過剰摂取は高血圧を惹起し、慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease: CKD) を進行させるだけでなく、交感神経活性亢進や血液凝固能異常を介した機序によりさらに腎障害を増悪させることが知られている。実際、塩分感受性高血圧ラットや、糖尿病性腎症モデルなど

の動物実験で、塩分過剰摂取は血圧を上昇させ、蛋白尿を増加させて腎障害を悪化させる促進因子であることが明らかにされている¹⁾。高血圧による腎障害モデルは腎硬化症モデルとして自然発症高血圧ラット (Spontaneous Hypertensive Rat) や食塩負荷マウスなど様々あるが、いずれも進行すれば末期腎不全に至り、

透析療法や腎移植などの腎代替療法を必要とする。CKD から末期腎不全にいたる経路は様々であるが、画期的な治療法はこの 30 年見つかっていない。CKD の進展機序と新規治療法を明らかにすることは、全世界共通の急務である。そこで、私は本研究において CKD のモデルとして繰り返す AKI から CKD に進展する AKI-to-CKD transition モデルマウスを用いて腎障害を惹起し、CKD の進展を抑制するための新たな治療法として、エピジェネティックな分子メカニズムを明らかにすることを目的に以下の実験を計画した。

2. 研究方法

2.1 研究の背景

慢性腎不全の進行にはさまざまな要因が関与することが明らかにされてきた。申請者が所属する研究室では、腎尿細管間質の慢性的な低酸素状態が、腎線維化の進行に寄与することを数多く報告してきた^{2,3}。腎尿細管間質が虚血や薬剤、高血糖などの腎障害によって低酸素状態になると、低酸素誘導因子 HIF1 (Hypoxia-inducible factor 1) が誘導されて、間質の線維芽細胞が活性化されて線維化が進行する。そのメカニズムには、様々なエピジェネティックな因子が関与することが報告されている⁴⁻⁷。エピジェネティックな因子には、DNA メチル化、ヒストン修飾、クロマチン立体構造、microRNA、non-coding RNA などが含まれる。これらは、DNA の遺伝情報が蛋白に翻訳されたのちに修飾を受けることで遺伝子発現制御に影響を与える。2000 年代以降の高速シーケンサーの技術向上によって、迅速に全ゲノム配列を解明することが可能となり、ヒストンテール部分の修飾を変化させる酵素群の機能が急速に解明されてきた。

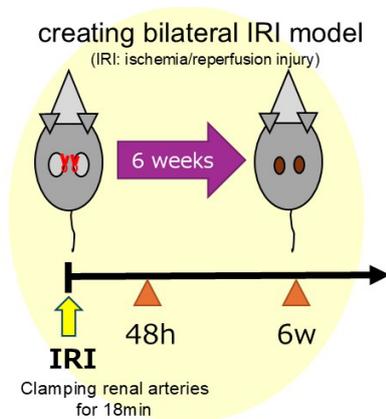


図 1. AKI-to-CKD transition モデルの作成方法

その結果、ヒストン脱メチル化酵素群の中でも一部の酵素群は、慢性的な低酸素刺激で発現が上昇することもこれまでに報告されている⁸。申請者は、HIF1 α の結合部位を網羅的に解析し、HIF1 と HIF1 によって誘導されるヒストン脱メチル化酵素の一つである KDM3A (Lysine demethylase 3A) が協調的にクロマチン立体構造を変化させることを明らかにした⁹。腎線維化の進行に関与するエピジェネティックな因子の分子メカニズムを明らかにすることは、腎線維化を抑制する新たな治療標的となりうる因子を同定することであり、大変重要である。

2.2 AKI-to-CKD transition モデルの作成

私は AKI のモデルとして両側腎動脈を 18 分間阻血する虚血再灌流モデルを用いて(図 1)、作成から 48 時間後の AKI モデル、6 週間後の CKD モデルを作成した。

2.2.1 尿細管細胞の抽出と RNA-seq

IR モデルマウスから尿細管細胞のみを単離する方法としては、尿細管の刷子縁 (brush border) に特異的に発現する Prominin-1 蛋白に対する抗体をつけた磁気ビーズを左室から注入して腎組織内に灌流させる(図 2)。Prominin-1 は近位尿細管細胞マーカーとして有用である。腎組織は皮質のみを切り出し、Cold active Collagenase 処理で細胞単位に分離した後、Prominin-1 抗体に結合した近位尿細管細胞のみを強力マグネットによりビーズごと回収する。申請者の所属する研究室では、この方法で腎組織から尿細管細胞のみを効率よく単離する方法を確立している。我々は、上記方法を用いて尿細管細胞のみを単離することに成功した。

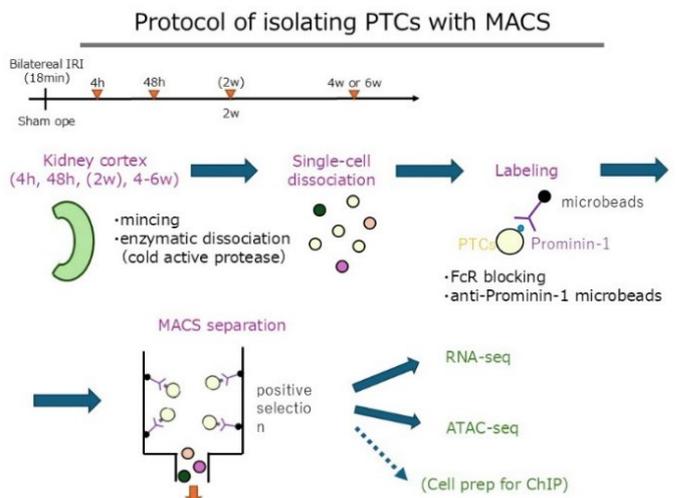


図 2. 磁気ビーズを使った尿細管細胞単離抽出方法

2. 2. 2 尿細管細胞の ATAC-seq

我々は、遺伝子発現変化に加えてオープンクロマチン領域を明らかにするために ATAC-seq をおこなった。ATAC-seq とは、Transposase という酵素がオープンクロマチン領域にアクセスして切断することで、抗体を使うことなくオープンクロマチン領域を網羅的に明らかにする手法である。ATAC-seq を図 3 のように可視化し、AKI, CKD の病態でオープンクロマチン領域がどのように変化するかを解析する。すなわち、全ゲノムの中で AKI によって誘導されるオープンクロマチンの比率や、CKD に移行したのもオープンのままである領域あるいは CKD の病態では再びクローズになるクロマチン領域を明らかにする。

2. 2. 3 培養尿細管細胞の HIF1 CHIP-qPCR

我々は、急性虚血再灌流障害によって惹起された低酸素刺激に対する尿細管細胞の応答を調べるため、初代培養尿細管細胞 RPTEC (renal proximal tubular epithelial cells), に低酸素刺激を行った際の HIF1 抗体を用いたクロマチン免疫沈降をおこなった。まずはエンハンサー領域における HIF1 の結合が正常酸素および低酸素分圧下でどのように変化するかを調べた。

Chromatin accessibility and ATAC-seq
ATAC-seq : assay for transposase-accessible chromatin with high-throughput sequencing
→ capture open chromatin sites

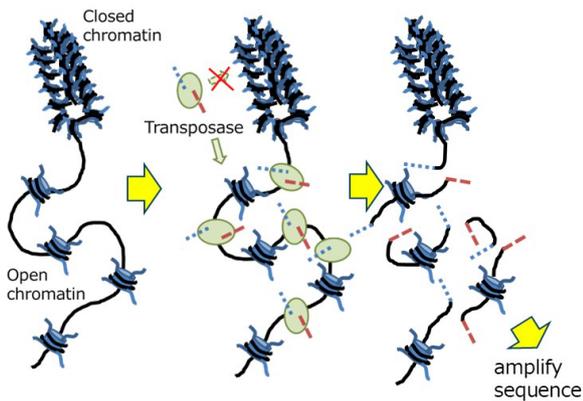


図 3. ATAC-seq は Transposase を用いてヌクレオソーム単位で切断する

2. 3. エンハンサーノックアウトマウスの作成

2. 3. 1 AKI-to-CKD transition に寄与するエンハンサーの同定

我々は、2. 2. 2と2. 2. 3でおこなった RNA-seq および ATAC-seq を組み合わせて解析した結果、正常酸素ではクローズなクロマチンが AKI 刺激でオープンクロマチンになり、CKD の病態移行後もオープンクロマチンのままである領域を同定した。さらにその中でも PTPN12 遺伝子のプロモーター領域から 91 kbp 上流にある領域が PTPN12 の遺伝子発現に影響を与えるエンハンサー領域 (PTPN12-E) と考えられた。そこで、そのエンハンサー領域をノックアウトしたマウスを CRISPER Cas9 を用いて作成した。

2. 3. 2 ノックアウトマウスに対する AKI-to-CKD transition モデルの誘導

我々は上記で作成したノックアウトマウスに対して両側 18~20 分の虚血再灌流障害を作成し、48 時間後の AKI および 6 週間後の CKD を評価した。

3. 研究結果

3. 1 AKI-to-CKD transition モデル

虚血再灌流障害作成後 48 時間後と 6 週間後の腎機能を採血の項目で調べた。BUN (尿素窒素) と Cre (クレアチニン) は図 4 に示す通り、急性腎障害の 48 時間でピークを迎え、CKD の 6 週間後には多少改善するものの、Sham と比較して障害が持続している。

また、図 5 に示すように、腎臓の線維化および萎縮は虚血再灌流から 6 週間後には進行する。このように本モデルは AKI-to-CKD transition モデルとして適していると考えられる。

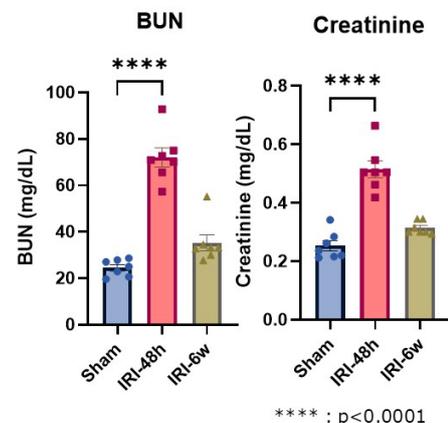


図 4. 各病態における腎機能

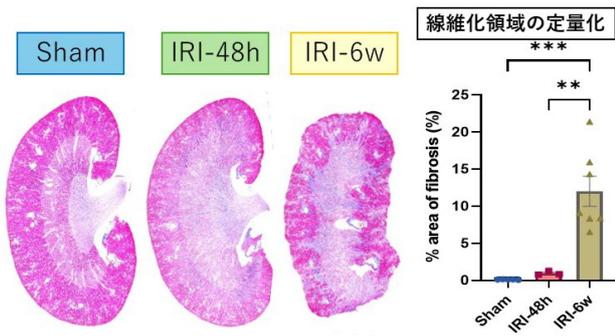


図5. 各病態における腎線維化の程度

3. 2 RNA-seq

上記のマウスモデルから磁気ビーズを用いて尿細管細胞を単離抽出し、RNA-seqを行った。その結果、図6に示すように Sham と比較して遺伝子発現パターンによって複数のクラスターに分類することができた。さらに、図7に示すように Sham と比較して 48 時間後に発現が上昇する遺伝子群と、6 週間後にも発現が上昇する遺伝子群、ともに満たす遺伝子群 133 個を同定した。また、48 時間後に発現が上昇するが、6 週間後までに発現が下がる遺伝子 Cluster に対して Gene Ontology 解析をおこなったところ、図8に示すように創傷治癒や炎症に関与する遺伝子群が主に関与することも明らかとなった。

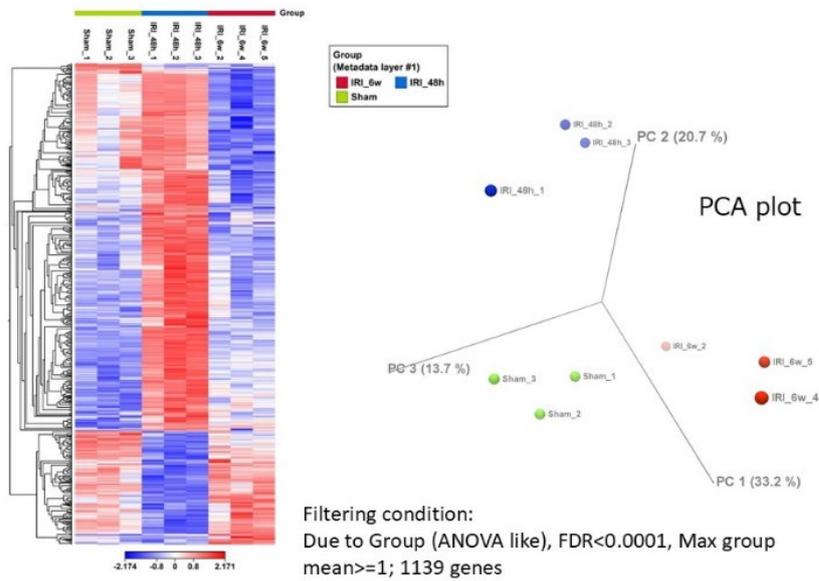


図6. 各病態における RNA-seq の結果

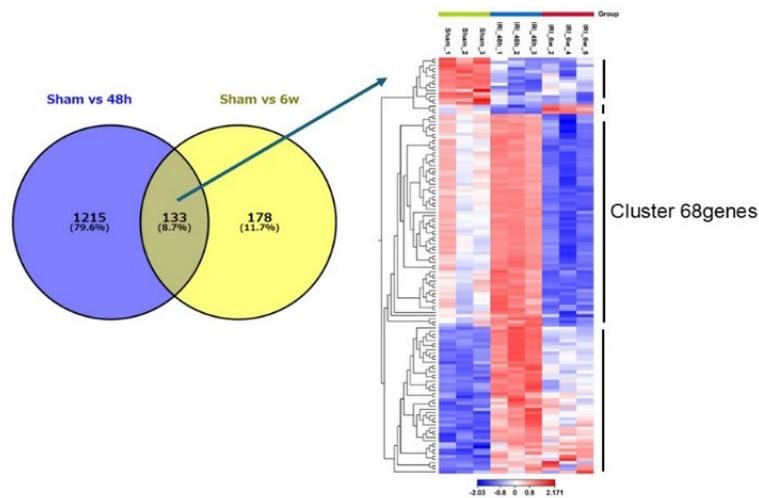


図7. Sham と比較して 48 時間後に発現が上昇する遺伝子群と 6 週間後も上昇する遺伝子群

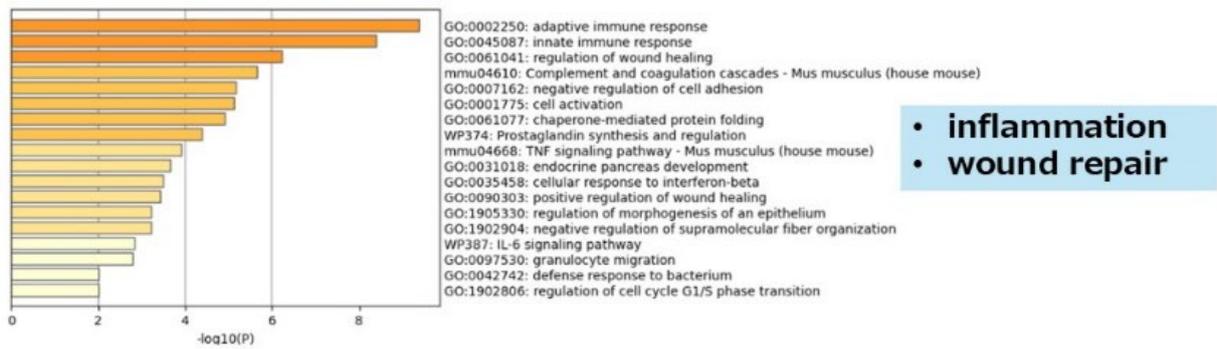


図 8. Gene Ontology の結果

3. 3 ATAC-seq

ATAC-seq の結果, 図 9 に示すように, オープンクロマチン領域を Sham, 48 時間後 AKI, 6 週間後 CKD で同定した。その中で, Sham ではクローズしていたが, 48 時間後にオープンに変化し, 6 週間後もオープンであり続けた領域 229 箇所を同定した。また, それらのオープンクロマチン領域が, 遺伝子のプロモーター領域に多いのか, exon 上に多いのか, intergenic な遺伝子間領域に多いのか, 分布を調べたところ, 48 時間後の AKI のときはプロモーター領域に多く, 30 日後までには遺伝子間領域に多くなるという分布の変化が見られた。

オープンクロマチンを維持する 229 箇所のピークの中でも, 特に PTPN12 遺伝子の 91 kbp 上流のピークは図 10 に示すように他にピークがなく, 近傍の遺伝子群の発現に影響を与えるエンハンサーと考えられた。

3. 4 HIF1 ChIP-qPCR

RPTEC に正常酸素下(A), 24 時間 1%低酸素下(B), さらに正常に戻してから 24 時間後(C)の 3 条件で ChIP-qPCR をおこなったところ, HIF1 が B と C でリクルートされていることが明らかとなった。すなわち低酸素刺激でリクルートされたのち, 24 時間後まで維持されることが明らかとなった(図 11)。

3. 5 エンハンサーノックアウトマウスの表現型

ノックアウトマウスから採血した際の生化学検査結果で Wild Type と比較して BUN, CRE などの腎機能, AST, ALT などの肝機能に特に明らかな異常は認められなかった。体重や身長にも差は認められなかった。

3. 6 ノックアウトマウスに対する AKI-to-CKD transition モデルの誘導

ノックアウトマウスと Wild Type に両側虚血再灌流障害を惹起した際の CKD は, 図 12 に示すように, KO のほうで軽減するプレリミナリーな結果を得た。現在, マウスの数を増やして検証中である。

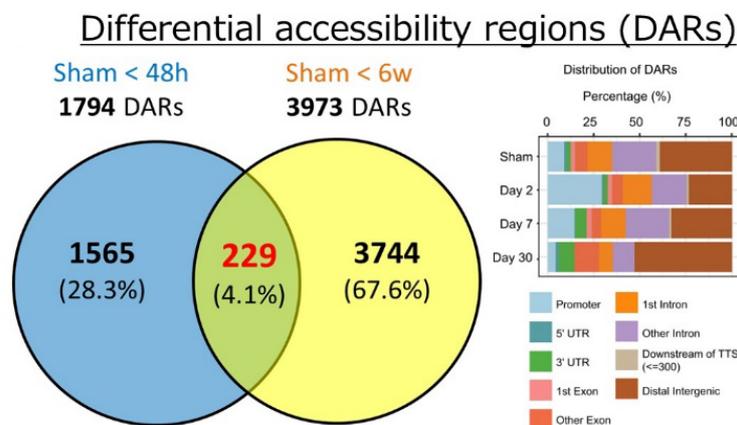


図 9. 各病態におけるオープンクロマチン領域の数

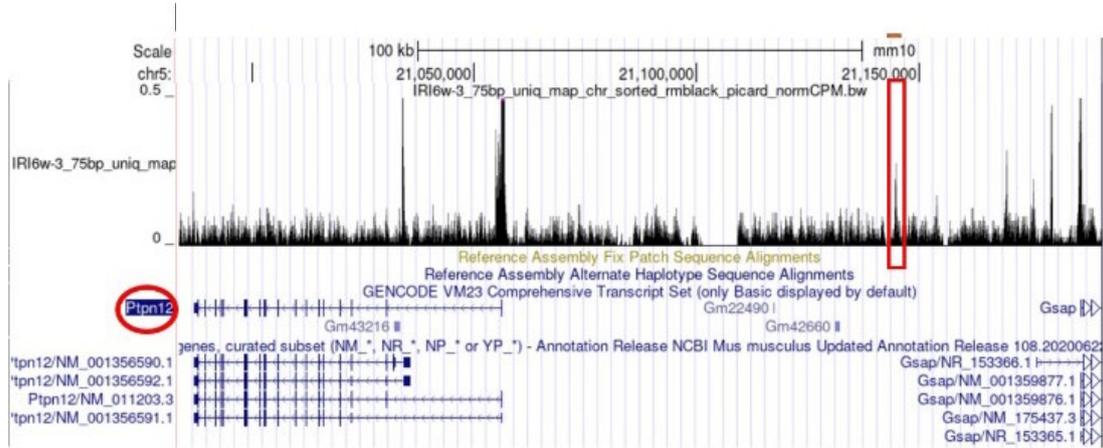


図 10. PTPN12 遺伝子の upstream 領域にあるエンハンサー領域

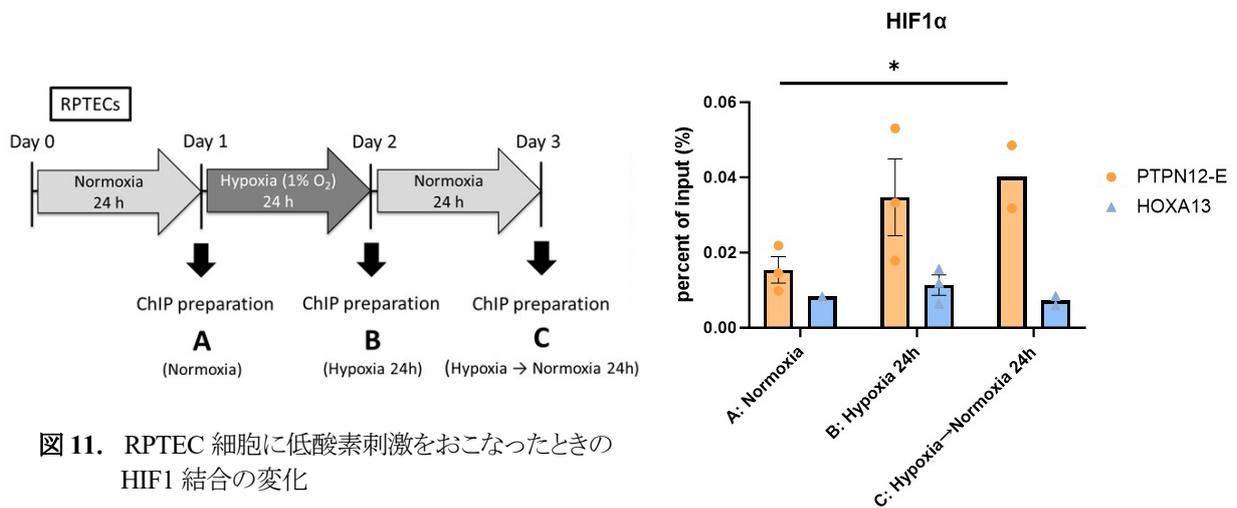


図 11. RPTEC 細胞に低酸素刺激をおこなったときの HIF1 結合の変化

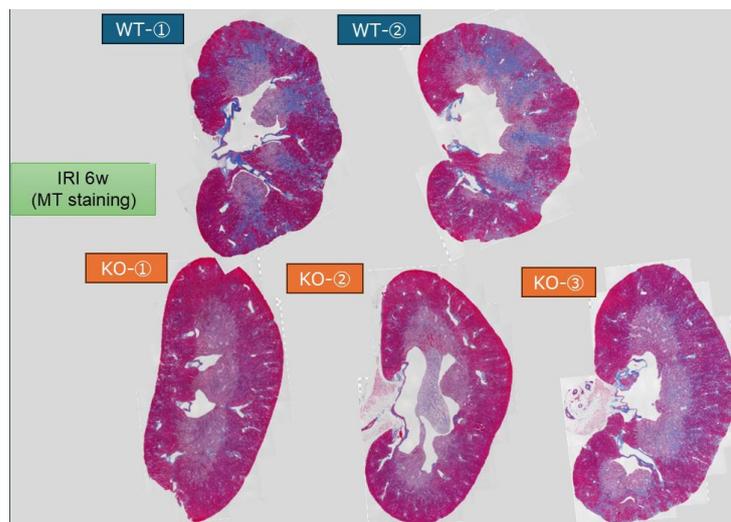


図 12. PTPN12-E ノックアウトマウスに AKI-to-CKD transition を惹起したときの CKD 線維化

4. 考察

本研究はAKIからCKDに移行する過程においてAKIで惹起されたエピジェネティックな変化がCKDの病態が形成される6週間後まで持続することでCKDの病態の増悪に寄与することを示唆している。特に、虚血再灌流障害は臓器への血流を遮断することによる急性虚血障害すなわち低酸素障害を起こすモデルであり、低酸素刺激によって惹起されたエピジェネティックな変化が持続することは低酸素メモリー(hypoxic memory)と呼ばれる。本研究では、低酸素によってクローズだったクロマチンがオープンクロマチンに変化することがhypoxic memoryであり、オープンであり続けることによってCKDへの病態が増悪すると考えられる。オープンクロマチン領域すなわちエンハンサー領域をノックアウトすることにより、AKIモデルを惹起してもCKDへの進行が食い止められたことから、このエンハンサー領域が病態増悪に寄与する標的と考えられる。

5. 今後の課題

AKIからCKDに移行する病態を食い止める新たな治療法として、本研究で同定したエンハンサー領域を腎臓の尿細管細胞特異的にノックアウトする治療薬が開発できれば、AKIを一度起こした患者でもCKDへの移行を食い止められる可能性がある。細胞特異的にゲノム上の特定の領域をノックアウトする方法としては、Crisper Cas9システムを用いたゲノム編集がある。尿細管細胞特異的にCrisper Cas9システムを用いてPTPN12のエンハンサー領域をノックアウトすることによりCKD進行抑制の治療薬を開発できる。課題としては、腎尿細管細胞へ到達させる方法は未解決の課題である。

6. 文献

- 1 Mimura, I., Chen, Z. & Natarajan, R. Epigenetic alterations and memory: key players in the development/progression of chronic kidney disease promoted by acute kidney injury and diabetes. *Kidney Int* **107**, 434-456, doi:10.1016/j.kint.2024.10.031 (2025).
- 2 Nangaku, M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* **17**, 17-25, doi:10.1681/ASN.2005070757 (2006).

- 3 Mimura, I. & Nangaku, M. The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol* **6**, 667-678, doi:10.1038/nrneph.2010.124 (2010).
- 4 Tanemoto, F. & Mimura, I. Therapies Targeting Epigenetic Alterations in Acute Kidney Injury-to-Chronic Kidney Disease Transition. *Pharmaceuticals (Basel)* **15**, doi:10.3390/ph15020123 (2022).
- 5 Tanemoto, F., Nangaku, M. & Mimura, I. Epigenetic memory contributing to the pathogenesis of AKI-to-CKD transition. *Front Mol Biosci* **9**, 1003227, doi:10.3389/fmolb.2022.1003227 (2022).
- 6 Saigusa, H., Mimura, I., Kurata, Y., Tanaka, T. & Nangaku, M. Hypoxia-inducible lncRNA MIR210HG promotes HIF1alpha expression by inhibiting miR-93-5p in renal tubular cells. *FEBS J*, doi:10.1111/febs.16794 (2023).
- 7 Miura, R. *et al.* Chromatin remodeling factor, INO80, inhibits PMAIP1 in renal tubular cells via exchange of histone variant H2A.Z. for H2A. *Sci Rep* **13**, 13235, doi:10.1038/s41598-023-40540-8 (2023).
- 8 Mimura, I., Tanaka, T. & Nangaku, M. New insights into molecular mechanisms of epigenetic regulation in kidney disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **43**, 1159-1167, doi:10.1111/1440-1681.12663 (2016).
- 9 Mimura, I. *et al.* Dynamic change of chromatin conformation in response to hypoxia enhances the expression of GLUT3 (SLC2A3) by cooperative interaction of hypoxia-inducible factor 1 and KDM3A. *Mol Cell Biol* **32**, 3018-3032, doi:10.1128/MCB.06643-11 (2012).

Elucidation of Epigenetic Factors Contributing to Suppression of Chronic Kidney Diseases Caused by Salt-Loaded Hypertension

Imari Mimura

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

Summary

1. Research Background and Objectives Excessive salt intake is known to exacerbate kidney injury through mechanisms such as elevated blood pressure, increased sympathetic nervous system activity, and abnormal blood coagulation, thereby contributing to the progression of chronic kidney disease (CKD). Animal studies have also demonstrated that salt loading promotes kidney dysfunction by raising blood pressure and increasing proteinuria. Elucidating the mechanisms underlying CKD progression and identifying new therapeutic approaches remain urgent global challenges. In this study, we employed an AKI-to-CKD transition mouse model—where acute kidney injury (AKI) progresses to CKD—with the aim of exploring novel therapeutic targets by focusing on epigenetic molecular mechanisms.

2. Methods An AKI model was established by performing bilateral renal ischemia-reperfusion (IR) for 18 minutes, with evaluations of AKI and CKD conducted at 48 hours and 6 weeks post-IR, respectively. Renal tubular epithelial cells were isolated from the kidneys, and RNA-seq and ATAC-seq analyses were performed to investigate changes in gene expression and chromatin accessibility. In parallel, primary human renal proximal tubular epithelial cells (RPTECs) were subjected to hypoxic stimulation, and chromatin immunoprecipitation (ChIP-qPCR) using an anti-HIF1 antibody was conducted to assess hypoxia-induced chromatin changes. A candidate enhancer region located 91 kb upstream of the **PTPN12** gene (designated **PTPN12-E**) was identified and knocked out using CRISPR/Cas9 technology in mice, which were then subjected to the same IR model.

3. Results RNA-seq analysis revealed distinct gene expression clusters among sham, AKI, and CKD samples. A total of 133 genes were found to be commonly upregulated in both the AKI and CKD stages. ATAC-seq identified 229 chromatin regions that were closed under sham conditions, became open after AKI, and remained open during CKD progression. Among these, a region located 91 kb upstream of the **PTPN12** gene appeared to function as an enhancer. ChIP-qPCR of RPTECs demonstrated sustained recruitment of HIF1 to this region under hypoxic conditions, even after reoxygenation. Preliminary data indicated that **PTPN12-E** knockout mice exhibited attenuation of CKD phenotypes following IR injury.

4. Discussion This study suggests the presence of “hypoxic memory,” wherein chromatin structural changes induced by AKI persist into the CKD phase and contribute to disease progression. Specifically, we propose that the sustained open chromatin status of certain enhancer regions, including **PTPN12-E**, plays a key role in the pathogenesis of CKD. Our findings support the potential of targeting such epigenetic alterations as a novel therapeutic strategy for preventing CKD progression.