

慢性腎臓病に対する創薬に向けて



医療と技術

猪 阪 善 隆*

Innovative drug development for chronic kidney disease

Key Words : epigenetics, autophagy, innovative drug

はじめに

ヒューマンサイエンス振興財団が調査した治療満足度調査データと製薬企業のアンメット・メディカル・ニーズに対する取り組み状況との関連について、医薬産業政策研究所が分析したデータ (図1) (http://www.jpma.or.jp/about/issue/gratis/newsletter/archive_until2014/pdf/2010_140_11.pdf) によると、高血圧症や糖尿病のように比較的治療満足度の高い疾患に対する新薬が開発されている一方、慢

性糸球体腎炎や糖尿病性腎症など慢性腎臓病 (chronic kidney disease; CKD) では治療満足度は低いにも関わらず、新薬の開発はなされていない。しかしながら、CKD に対する新規治療のシーズがないわけではなく、アカデミアの果たす役割は大きい。本稿では CKD に対する新規治療のためのシーズ開発の観点から、我々が研究を行っているエピジェネティクスとオートファジーの2つの話題について紹介したい。

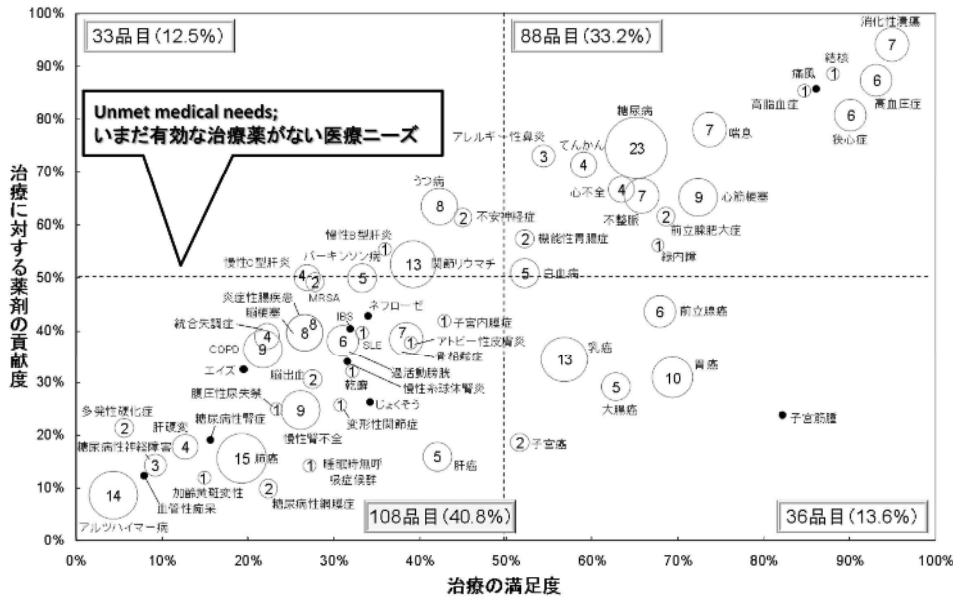


図1 治療満足度 (2005年) 別にみた新薬の開発状況 (2010年) 医薬産業政策研究所 HP より改変



* Yoshitaka ISAKA
 1962年7月生
 大阪大学大学院医学系研究科博士課程修了 (1994年)
 現在、大阪大学大学院 医学系研究科 腎臓内科学 教授 医学博士
 腎臓内科学
 TEL : 06-6879-3857
 FAX : 06-6879-3230
 E-mail : isaka@kid.med.osaka-u.ac.jp

エピジェネティクスとは

ゲノムは生命の設計図ともいわれ、ゲノムにおける塩基配列の違いが個々の表現型の違いをもたらすとされる。しかし、個々におけるゲノムの差異は意外と小さく、ヒトとチンパンジーでさえ、その違いは2%以下でしかない。一卵性双生児の一方が自閉症を発症した場合、60-90%が他方も発症すると報告されており、遺伝的素因が強い。しかし、ゲノム

がすべてを決定するわけではなく、その差を生み出すのがエピジェネティクスと考えられている。エピジェネティクスとは、DNAの塩基配列の変化を伴わずに、染色体における変化によって生じる、安定的に受け継がれうる表現型と定義されている。このようなエピジェネティックな変化には、DNAのCpG部位でのメチル化やヒストンのN末端（ヒストンテール）のアセチル化、メチル化などのヒストン修飾、さらには non-coding RNA やクロマチン立体構造が関わっている（図2）。

個体は発生・分化の過程で、活動している遺伝子と休止している遺伝子を整然と決定することにより、体内の各細胞へと分化させ、個体を形成させる。発生・分化が完了したのちも、いったん樹立した活動している遺伝子と休止している遺伝子は細胞分裂しても基本的に維持される。しかし、外界からの刺激に応じて、（少なくとも長期的に）非可逆的にエピジェネティックな変化を起こすことにより環境に対応する仕組みを持っている。

一方で、異常なエピジェネティック修飾が何らかの要因で誘発されると、（たとえ、環境に対する代償

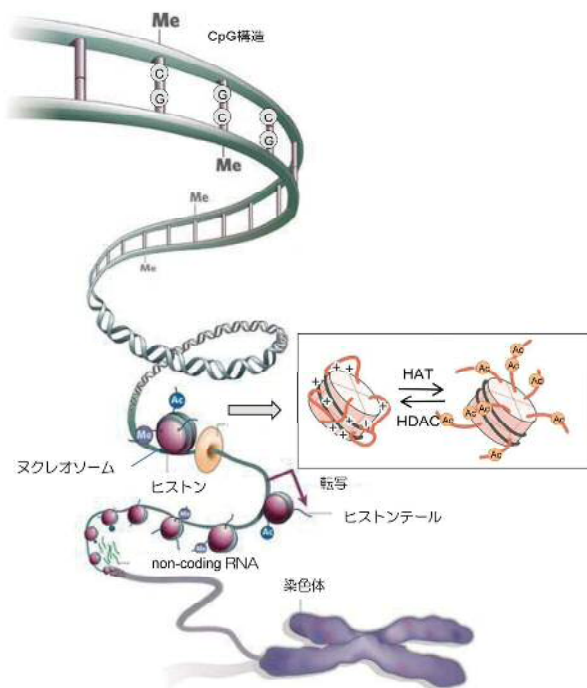


図2 エピジェネティクスの担い手DNAはヒストンに巻き付いてヌクレオソーム構造をとる。DNAのCpG部分のシトシン(C)のメチル化やヒストンテールのメチル化・アセチル化、さらには non-coding RNA により遺伝子発現調節を受ける。ヒストンのアセチル化が起ると、遺伝子発現が亢進する。

であり、後に環境が改善したとしても）その修飾は維持されたまま残ってしまう。例えば、1944年の冬、オランダ西部の住民は飢餓状態に陥ったが、その中には妊娠中の女性もあり、ちょうど胎生前期に飢餓期を迎えた人は50歳時に高血圧や糖尿病、冠動脈疾患などの罹患率が高いことが示された。この現象は、胎児期の栄養不足を補うためにエピジェネティックな代償機構が働き、できるだけ栄養を取り込むように適応したことによる。出生後普通に栄養を摂取すると、相対的に栄養過多の状態となり、生活習慣病を起しやすくなったと解釈されている。

エピジェネティクス研究の進歩を支えたのは解析技術の進歩でもある。DNAメチル化の全ゲノム解析（メチローム解析）も次世代シーケンサーを用いて容易に解析できるようになっている。ヒストン修飾の解析もクロマチン免疫沈降法の開発により、個別ゲノム領域について可能となり、さらにマイクロアレイや次世代シーケンサーと組み合わせることによりゲノム全体でのヒストン修飾も決定できるようになっている（図3）。クロマチン免疫沈降法は、クロマチン構成蛋白、蛋白修飾及び遺伝子結合蛋白に対する抗体による免疫沈降反応で、この方法を用いることにより、この抗体に対する蛋白及び蛋白修

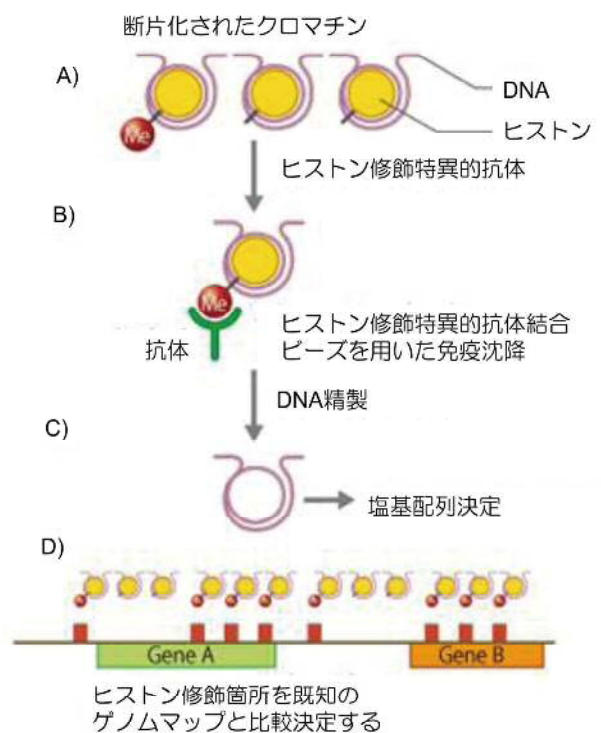


図3 クロマチン免疫沈降法による全ゲノム解析 (ChIP-seq)

飾が存在する部位の遺伝子配列を明らかにすることが可能となっている。シーケンサーは、DNA配列を正確に読み取ることが出来る機械であり、従来のキャピラリーシーケンサーが数百bpのDNA配列を読み取れるのに対して、次世代シーケンサーは最高で100Gbp(10¹¹bp)のDNA配列を読み取ることが可能となっている。また、ゲノム部位同士が近接しているかどうかを解析する手法も開発され、クロマチン高次構造変化による遺伝子発現調整も解析されている。

エピジェネティクス調整機構

エピジェネティクス調整機構の代表がヒストン修飾である。ヒストンの周囲に遺伝情報の本体であるDNAが巻き付く形のヌクレオソームがクロマチンの基本構造となっている。ヌクレオソームを構成する4種類のコアヒストン(H2A, H2B, H3, H4)はアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化など様々な翻訳後修飾を受ける。ヒストン修飾がゲノム制御に与える影響は2種類に分けられる。一つはヒストン修飾が直接クロマチン構造に影響を与えるものである(シス型)。例えば、ヒストンのリジン残基のアセチル化によりNH₃⁺の陽性電荷が中和され、陽性に強く荷電しているヒストンと陰性に荷電しているDNAとの相互作用が減弱するため、転写因子が入り込むスペースができて、転写が正に制御される(図2)。ヒストンのアセチル化はヒストンアセチル基転移酵素(histone acetyltransferase; HAT)によってアセチル基が供与され、逆にヒストン脱アセチル化酵素(histone deacetylase; HDAC)によって取り除かれる。もう一つは、ヒストン修飾がクロマチンなどと相互作用している分子の結合を阻害する、あるいは逆にエフェクター分子の結合を促進するものである(トランス型)。ヒストンのメチル化はヒストンの電荷には大きな影響を与えないが、トランス型の制御機構により、遺伝子発現を制御している。

腎疾患とエピジェネティクス

疾患におけるエピジェネティックな変化の関与については、UKPSD研究において糖尿病強化療法が試験中止後の観察期間において長期予後を改善したことがよく知られており(1)、Legacy effectあるいは

Metabolic Memoryと呼ばれている。実際、高血糖は血管平滑筋細胞のヒストンH3の9番目のリジン残基(H3K9)のメチル化を起すことによりNk-κBの発現が亢進し、炎症を惹起することも報告されている。興味深いのは、いったん高血糖に暴露されると、その後血糖が改善してもエピジェネティックな変化は持続することである。慢性炎症は腎疾患の進展に関与することもよく知られており、炎症自体がエピジェネティックな変化を誘導すること、例えばDNAのメチル化と関連することが報告されている。また、miRNA(miR-155, miR-146, miR150, miR181, miR223)が炎症におけるエピジェネティックな制御に関わることも報告されている。

腎疾患の進展に関わる線維化においても、エピジェネティックな関与があることが報告されている。例えば、Ras阻害因子をコードするRASAL1遺伝子のメチル化は線維芽細胞を活性化するとともに、腎の線維化を誘導する。また、強力な線維化因子であるTGF-βは、H3K4のメチル基転移酵素であるSET7/9の活性を亢進させることにより、H3K4のメチル化を誘導し、線維化をきたすことが報告されている。さらに、miR-192は一側尿管結紮モデルや5/6腎摘モデルにおいて、腎臓での発現が亢進し、TGF-βやSmad3シグナル活性化に関わるとともに、miR-192欠損によりTGF-βによるコラーゲン産生が抑制されることも報告されている。

Na-Cl共輸送体(NCC)は遠位尿細管に発現し、Na再吸収に関与する。NCCの活性を抑制する転写因子WNK4の活性低下によりNCCの活性が上昇すると高血圧症を呈する。交感神経系の活性化によりHDAC活性が低下することによりWNK4のプロモーター領域のアセチル化が持続することにより、塩分感受性高血圧をきたすことが報告されている。

ヒストン修飾の網羅的解析

多発性嚢胞腎の原因遺伝子であるPKD1遺伝子を生後13日目までにノックアウトすると嚢胞形成が起こるが、14日目以降にノックアウトした場合には嚢胞腎には進展しない。マウスの腎臓では、生後14日目を境として、遺伝子発現が劇的に変化し、細胞増殖期から細胞肥大期に移行することが知られている。我々は、このような遺伝子発現の変化にはエピジェネティックな要因が関与している可能性が高

いと考え、生直後からのヒストン修飾の変化を網羅的に検討した(2)。H4K20はこれまで植物のみでしか報告がなかったが、哺乳類の細胞から大量のヒストン蛋白を抽出し、蛋白質研究所高尾研究室との共同研究により、質量分析機を用いてH4K20のアセチル化が哺乳類細胞に存在することを明らかとした(図4)。さらに、生後11.5日、14.5日、19.5日のヒストンH4のアセチル化の程度の変化を検討すると、ヒストンH4のアセチル化の変化は3パターンに分かれ、アセチル化の程度の変化しないH4K8などに対し、

細胞増殖と関係の深いH4K5やH4K12は細胞増殖期の出生直後にはアセチル化は亢進しているが、14.5日目以降アセチル化が低下する。一方、我々が新規に見出したH4K20は、出生直後はほとんどアセチル化していないが、細胞肥大期にあたる14.5日目以降にアセチル化が亢進する(図5A)。前述したように、アセチル化が起こると通常遺伝子発現が亢進するが、H4K20のアセチル化のChIP-seqの結果、H4K20のアセチル化(H4K20ac)は遺伝子発現が抑制されている遺伝子の転写開始領域に認められる

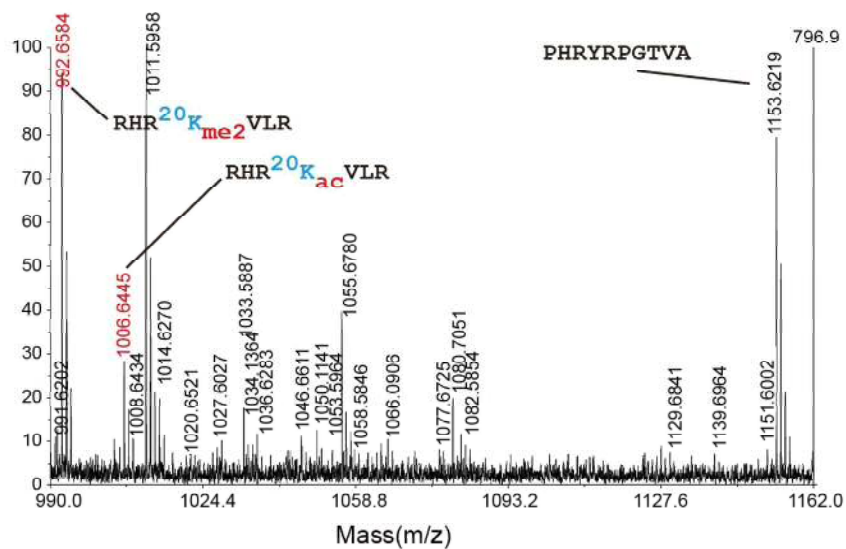


図4 質量分析法によるH4K20acの存在確認

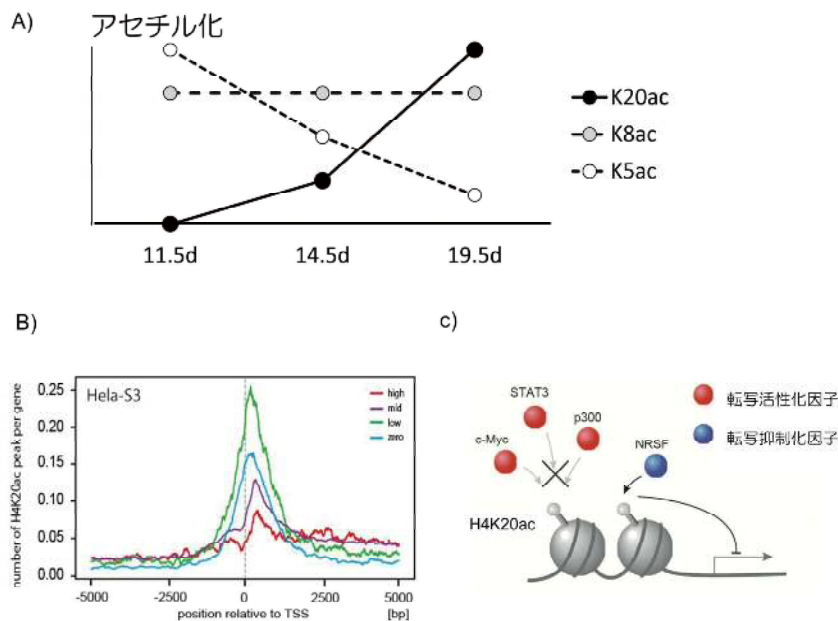


図5 A) ヒストンH4のアセチル化の経時的変化
 B) H4K20acの遺伝子 promoter 部位における genome wide の分布
 C) H4K20ac 遺伝子発現調節機構

ことが判明した (図5B)。ChIP-seq やモチーフ解析を用いて検討したところ、転写開始部位にH4K20のアセチル化が起こると、c-Myc, STAT3, p300のような細胞増殖に関わる転写活性化因子はDNAに結合できず、転写抑制化因子であるとともに、細胞肥大を促す neuron-restrictive silencer factor (NRSF) のみが転写開始部位に結合することが明らかとなった (図5C)。このことから、H4K20acは遺伝子発現を細胞増殖期から細胞肥大期へと変換させることが示唆された。ヒストン修飾をはじめとする、エピジェネティックな因子は、様々な疾患の発症・進展に関係することが、疫学研究から明らかになっており、そのメカニズムに興味が集まっている。このH4K20acを用いて、糖尿病をはじめとする代謝疾患、心肥大をはじめとする循環器疾患、腎疾患、癌などの様々な疾患の発症・進展のメカニズムについての研究が進むことが期待される。

オートファジーとは

真核生物は「自己の細胞質構成成分を隔離し、リソソームの酸性コンパートメント内で分解するシステム」として、オートファジー・リソソーム系を有している。オートファジーは飢餓時に強く誘導され、エネルギー産生や生存に必須な蛋白質合成のために、細胞内の変性蛋白質などを分解し、アミノ酸などを供給するシステムである。また、傷害を受けたミトコンドリアなどのオルガネラのリサイクリングにも寄与している (図6)。

オートファジーはエネルギーやアミノ酸などの供給の点において重要であるが、凝集した蛋白や傷害を受けたオルガネラをリサイクルすることにより細胞の恒常性維持にも関与する。さらに、虚血傷害などに対して保護的作用を有するなど、病態への関与も報告されている (図7)。

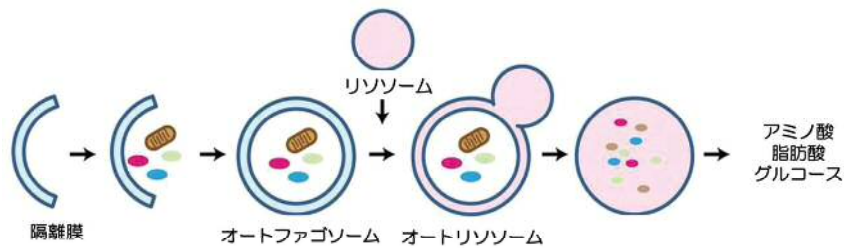


図6 オートファジー進展のメカニズム傷害を受けたオルガネラや変性蛋白などを取り囲むように隔離膜が進展し、二重膜のオートファゴソームが形成される。これはリソソームと融合し、オートリソソームとなり、内容物が分解される。

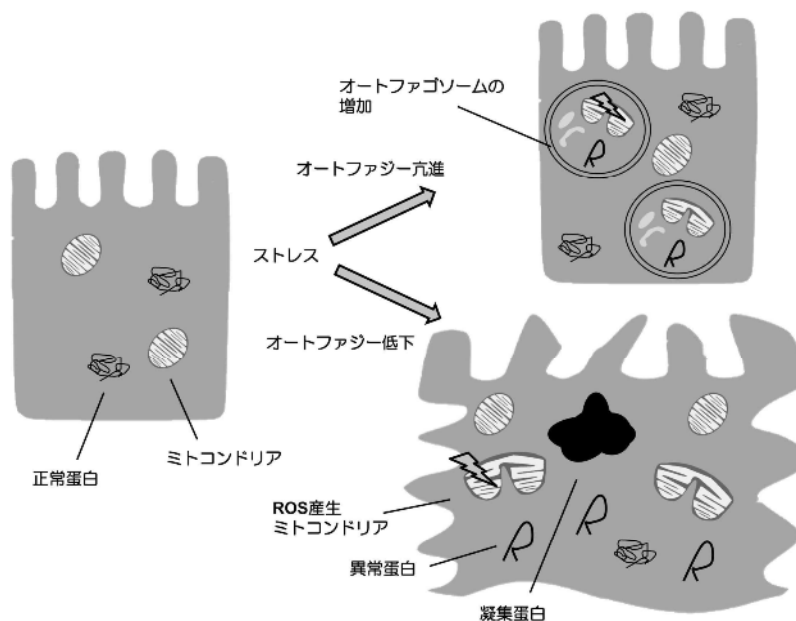


図7 尿細管細胞に対するオートファジーの保護効果

加齢とオートファジー

近年のオートファジーに関わる遺伝子群の同定および分子メカニズムの解明は、オートファジー研究を大きく進展させた。オートファジーの関与を検討するには、オートファジーに必須の蛋白をコードする遺伝子（例えばAtg5）のノックアウト（KO）マウスの解析が有用であるが、全身のAtg5 KOマウスは生後すぐに死亡するため、細胞特異的なKOマウスが作成されている。我々が作成した近位尿細管細胞特異的Atg5 KOマウス(3)は、若年齢ではほとんど形態・機能変化を示さないが、6ヶ月齢で近位尿細管機能傷害の指標である軽度の尿糖とアミノ酸尿を呈する。9ヶ月齢になると、近位尿細管細胞は著明に腫大し、細胞質にPAS弱陽性の均質な沈着物およびユビキチン陽性・p62陽性の蛋白凝集塊を認め、また形態異常を呈するミトコンドリアの集積を示すようになる。さらに、2年齢になると線維化を示す(4)。加齢により処理すべき変性蛋白や異常オルガネラが増加するが、ある程度までは代償機構により基礎レベルのオートファジーが亢進することにより腎障害は顕在化しないが、飢餓などのストレスが生じた際の反応性オートファジーは低下しており、軽度のストレスで腎障害が顕在化しやすくなることが明らかとなった。

生活習慣病とオートファジー

最近、我々は近位尿細管特異的オートファジー不全マウスを用いて、高尿酸血症が近位尿細管細胞のリソソーム破綻を介して、尿細管傷害をきたしうる

ことを報告した(5)。オートファジー機構が保たれている場合は、尿酸塩結晶によりリソソームが破綻しても、カテプシン等を漏出したリソソームをオートファゴソームが取り囲むことにより、細胞保護的に作用するが、オートファジー機能が低下すると、漏出したカテプシン等が細胞質内に広がってしまい、炎症が惹起され、近位尿細管傷害をきたす。オートファジーは活性酸素を産生したミトコンドリアを消去することにより、尿細管細胞に対して保護的に作用する(6)が、老化等によりオートファジー機能が低下すると、炎症が惹起されやすいと考えられる。

凝集蛋白から創薬を図る

我々は、上記のようなオートファジー不全モデルマウスを用いた検討から、腎障害進展を抑制する薬剤の開発を目指しているが、その方法の一つを紹介する。オートファジー不全尿細管細胞においては、加齢に伴い尿細管細胞に凝集蛋白が蓄積するが、この凝集蛋白も炎症を惹起することが推察されている。そこで、この凝集蛋白をmicrodissection法を用いて、2000個抽出し、shotgun解析を行ったところ、さまざまな蛋白が存在することが明らかとなった(図8)。この蛋白のうちの一つを尿細管細胞において発現しないようにしたKOマウスと近位尿細管特異的Atg5KOマウスを交配して、その病態を解析しているところである。このような試みにより、腎障害進展を抑制する薬剤が開発できるのではないかと期待している。

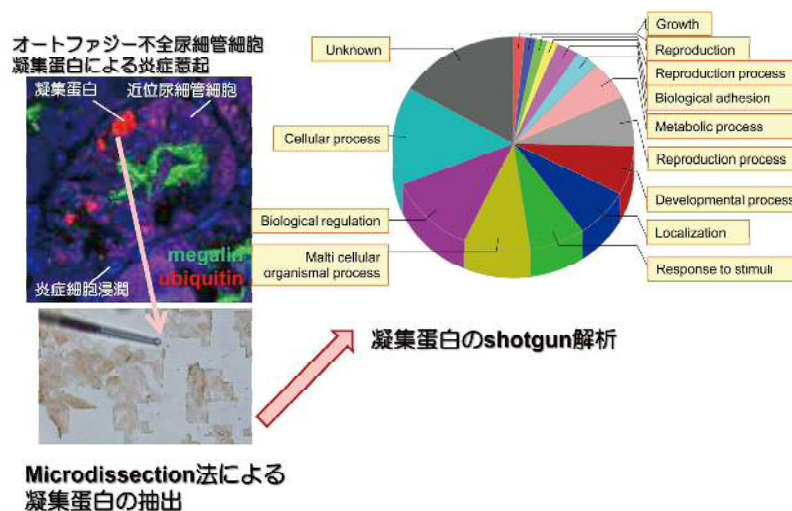


図8 オートファジー不全尿細管細胞からの創薬開発のための手法

文献

1. Holman, R.R., Paul, S.K., Bethel, M.A., Matthews, D.R., and Neil, H.A. 2008. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 359:1577-1589.
2. Kaimori, J., Maehara, K., Hayashi-Takanaka, Y., Harada, A., Fukuda, M., Yamamoto, S., Ichimaru, N., Umehara, T., Yokoyama, S., Matsuda, R., et al. 2016. Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells. *Scientific Reports* in press.
3. Kimura, T., Takabatake, Y., Takahashi, A., Kaimori, J.Y., Matsui, I., Namba, T., Kitamura, H., Niimura, F., Matsusaka, T., Soga, T., et al. 2011. Autophagy protects the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 22:902-913.
4. Yamamoto, T., Takabatake, Y., Kimura, T., Takahashi, A., Namba, T., Matsuda, J., Minami, S., Kaimori, J.Y., Matsui, I., Kitamura, H., et al. 2016. Time-dependent dysregulation of autophagy: implications in aging and mitochondrial homeostasis in the kidney proximal tubule. *Autophagy*:0.
5. Maejima, I., Takahashi, A., Omori, H., Kimura, T., Takabatake, Y., Saitoh, T., Yamamoto, A., Hamasaki, M., Noda, T., Isaka, Y., et al. 2013. Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO J* 32:2336-2347.
6. Takahashi, A., Kimura, T., Takabatake, Y., Namba, T., Kaimori, J., Kitamura, H., Matsui, I., Niimura, F., Matsusaka, T., Fujita, N., et al. 2012. Autophagy guards against cisplatin-induced acute kidney injury. *Am J Pathol* 180:517-525.

