

平成30年6月5日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09296

研究課題名(和文) TET2によるエピゲノム制御を介したミネラルコルチコイド活性制御と高血圧発症機構

研究課題名(英文) The role of TET2 in mineralocorticoid receptor mediated transcription through epigenetic mechanisms and development of hypertension

研究代表者

小林 佐紀子 (Kobayashi, Sakiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任講師

研究者番号：80383727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ミネラルコルチコイド受容体(MR)のエピゲノムを介した転写活性化の分子メカニズムの解明のため、新規MR相互作用因子スクリーニングで得られた因子のうち、脱メチル化酵素であるten-eleven translocation 2(TET2)に注目した。TET2のknock downによりアルドステロンによるMR標的遺伝子のSGK1とENaCのmRNAレベルの増加の抑制が認められ、TET2はMRの転写活性を促進する転写促進因子であることが示唆された。他のMRスクリーニングで同定されたエピゲノムに関連する因子についても転写共役因子である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanisms of MR mediated transcription through epigenetic mechanisms, we decided to focus on one of demethylase, ten-eleven translocation 2(TET2) among MR interacting proteins which were obtained in our MR-interacting protein-screening. Knock down of TET2 suppressed the transcriptional activation of MR target genes, SGK1 and ENaC, by aldosterone and it was suggested that TET2 transactivates MR mediated transcription. Other proteins related to epigenetic mechanisms which were obtained in our screening were also shown to control MR mediated transcription.

研究分野：内分泌内科

キーワード：ミネラルコルチコイド受容体 転写共役因子 エピゲノム 高血圧

1. 研究開始当初の背景

近年、RALES 研究 (N.Eng.J.Med.341:709-717,1999) や EPHEBUS 研究 (N.Eng.J.Med.348:1309-1321,2003) を初めとする多くの大規模臨床研究の結果から、心不全や高血圧といった循環器系疾患の病態生理にミネラルコルチコイド受容体(MR)の活性化が非常に重要な役割を担うことが明らかとなっており、現在これらの疾患を治療する上で MR 作用メカニズムを解明することは必須となっている。MR は、リガンドであるアルドステロンの結合により活性化されると、標的遺伝子のプロモータの MR 応答配列に結合し、転写共役因子と呼ばれる蛋白質複合体を標的遺伝子プロモータに動員させる。そして標的遺伝子 ENaC や SGK1 発現量を活性化し、血圧を調節していると考えられている。転写共役因子の中には、ヒストンのアセチル化やメチル化などの修飾に関わる酵素と DNA の脱メチル化に関わる酵素などが含まれるこのようなゲノム配列の変化を伴わない遺伝子発現制御メカニズムはエピゲノムと呼ばれ、転写調節において中心的な役割を果たすことが知られている。しかしながら MR のエピゲノムを介した標的遺伝子転写活性化の分子メカニズムやヒストン修飾と DNA 脱メチル化のクロストークについては未だ不明な点も多い。

2. 研究の目的

本研究で我々は新規 MR 転写共役因子を探索・同定し、その機能解析を行うことで、MR によるエピゲノム制御機構を初めて明らかにすることを目的とする。これまでに我々は、FLAG-MR 安定発現細胞株を樹立し、大量培養ののち回収し、核抽出物を取得後 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い、MR 相互作用因子群の精製を試みた結果、銀染色にて精製の成功を確認した(図1)。

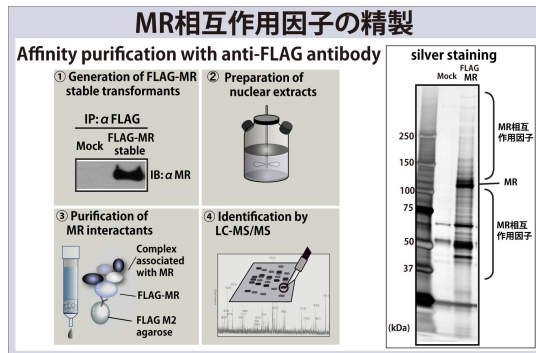


図1

サンプルを LC-MS/MS に供し蛋白同定を試みたところ、多くの相互作用因子候補蛋白質が同定されたが、このうち我々は ten-eleven translocation 2(TET2)に注目した。TET2 は C 末

端側に典型的な α -ケトグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼ活性を有しており、MR 標的遺伝子プロモータにおいてゲノム DNA のシトシンの脱メチル化を生じて遺伝子発現活性化に関わる役割が推測される。ES 細胞や始原生殖細胞に限定的に発現している TET1 や卵細胞に発現している TET3 と異なり、TET2 は ES 細胞に加えて幅広い組織に発現していることが報告され、TET2 の異常は骨髄系腫瘍の病態生理に重要な役割を果たすことがこれまで知られていたが、高血圧などの生活習慣病における TET2 役割は未知である。よって本研究では TET2 の MR 転写調節における役割の解析を目的とする。

3. 研究の方法

まず TET2 knock down 下での MR 活性を Luciferase assay で評価する。次に TET2 の過剰発現や RNAi でノックダウンしたときに、MR 転写活性に及ぼす影響を内因性の MR 標的遺伝子の発現量の定量を行い確認する。同時に MR と TET2 の蛋白-蛋白相互作用を共免疫沈降法で確認する。またアルドステロン投与による細胞核内での共局在を免疫染色をもちいて確認する。さらに、マウスの臓器を用いて組織分布を確認し、MR 発現臓器と共局在していることを確認する。

次に MR 標的遺伝子である ENaC のプロモーター領域に MR や TET2 が動員されることを ChIP アッセイにより確認する。また DNA 脱メチル化酵素阻害剤アザシチジンやデシタピンを細胞に投与したときに、これらの標的遺伝子発現量が抑制されることをリアルタイム qPCR 法にて確認する。そしてプロモータ領域に動員された TET2 が、DNA の脱メチル化を介して MR 標的遺伝子発現を活性化させることを、バイサルファイトシークエンス法を用いて確認する。また TET2 の RNAi により脱メチル化が減少することも確認する。SRC-1 や p300 といった代表的なヒストンアセチル化酵素や、我々が MR 相互作用因子スクリーニング実験ですでに同定したヒストンメチル化酵素、脱メチル化酵素に焦点を当て、これらの酵素と TET2 との相互作用や細胞内共局在の有無、TET2 の RNAi におけるヒストン修飾の変化などを網羅的に解析し、反対にヒストン修飾酵素の RNAi における DNA 脱メチル化活性の変化を解析することで両者の機能連携メカニズムを明らかにする。

また、糖尿病や慢性腎臓病、肥満などで TET2 の異常な活性化から MR 転写が活性化し高血圧が惹起される可能性を検討するため、高濃度のグルコースで培養した細胞や H_2O_2 など

で酸化ストレスを与えた細胞において TET2 の脱メチル化酵素活性に及ぼす影響を解析し、db/db マウスやストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルマウスにおいて同様に TET2 の脱メチル化酵素活性を解析する。更に MR と TET2 の相互作用を阻害するペプチドなどの投与により MR 活性化を抑制することで高血圧の新規治療のターゲットになりうることを示す。

4. 研究成果

TET2 の MR 転写活性に与える影響を調べるために、TET2 の knock down のための shRNA を作成し、TET2 knock down 下での MR 活性を Luciferase assay で評価したところ、MR 活性には変化が見られなかった。これは、Luciferase assay で用いるレポーター遺伝子ベクターには TET2 の標的となる CpG island が含まれていないためであり、TET2 は MR との相互作用においても CpG island を要することを示唆していると考えられた。次に MR stable HEK293 細胞において TET2 の knock down を行い、アルドステロン処置による MR 標的遺伝子の SGK1 と ENaC の mRNA 発現をリアルタイム PCR で評価したところ、いずれの標的遺伝子も mRNA レベルでの低下が認められた(図2)。

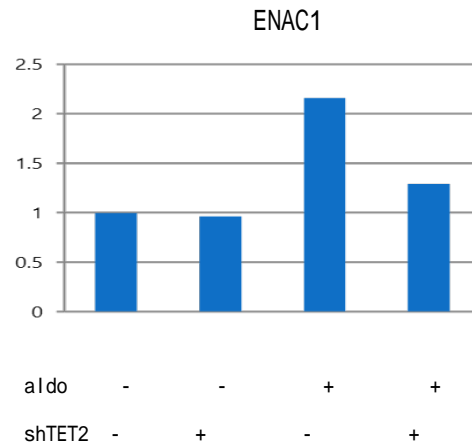
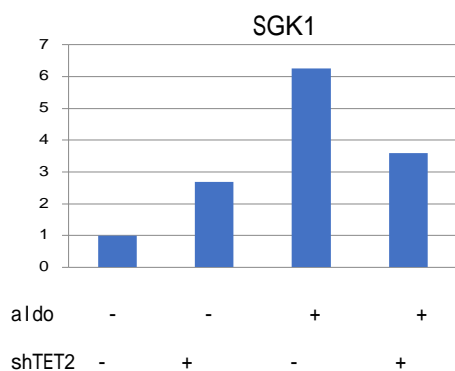
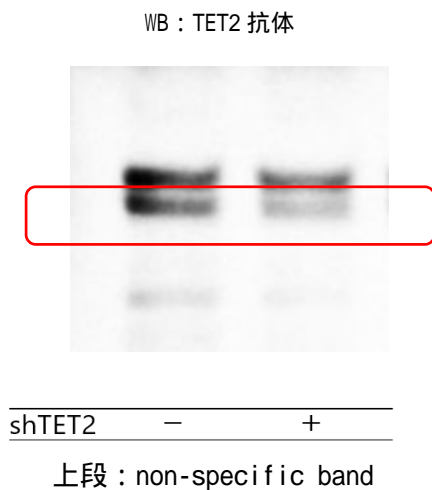


図2

このことから TET2 は MR の転写活性を促進する転写促進因子であることが示唆された。TET2 を MR と共に HEK293 細胞に強発現させ、共免疫沈降法により細胞内の相互作用を検討したが、有意な結合が認められなかった。その後様々な条件下で共免疫沈降法を再検討したが、結合の確認はできなかった。

そのため、MR 相互作用因子スクリーニングで発見された TET2 以外の因子のうち、脱メチル化酵素である KDM4B, UTX, ヒストンメチル化酵素である EHMT1, EHMT2, ヒストンアセチル化酵素である MYST1, ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC2 について同様の解析を行うこととした。shRNA により mRNA レベルで 50%以上の knock down が得られた UTX, EHMT2, HDAC2 についてこれらの因子の knock down が MR の転写活性に与える影響を検討したところ、KDM4B および HDAC2 については有意な変化を認めなかったが、UTX, EHMT2 については軽度の低下を認め、UTX および EHMT2 が転写促進因子である可能性が示唆された。今後は shRNA の条件検討および蛋白レベルでの発現の低下の確認を行い、有意に転写を調節する因子についての解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Mitsuishi Y, Shibata H, Kurihara I, Kobayashi S, Yokota K, Murai-Takeda A, Hayashi T, Jo R, Nakamura T, Morisaki M, Itoh H. Epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase pathway enhances mineralocorticoid receptor transcriptional activity through protein stabilization. *Mol Cell Endocrinol.* S0303-7207(18)30017-0. doi:

- 10.1016/j.mce.2018.01.007. 査読あり
2. Kobayashi S, Yoshimura Noh J, Shimizu T, Sato T, Kurihara I, Sugino K, Itoh H, Ito K. A case of familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia (FDH) in Japan: FDH as a possible differential diagnosis of syndrome of inappropriate secretion of thyroid-stimulating hormone (SITSH). *Endocr J*. 2017, 64(2):207-212. doi: 10.1507/endocrj.EJ16-0135. 査読あり
 3. Fujii K, Miyashita K, Kurihara I, Hiratsuka K, Sato S, Yokota K, Kobayashi S, Shibata H, Itoh H. Adrenal Insufficiency under Standard Dosage of Glucocorticoid Replacement after Unilateral Adrenalectomy for Cushing's Syndrome. *Case Rep Endocrinol*. 2016;2016:2347528. doi: 10.1155/2016/2347528. 査読あり
 4. Yoshihara A, Noh JY, Watanabe N, Mukasa K, Ohye H, Suzuki M, Matsumoto M, Kunii Y, Suzuki N, Kameda T, Iwaku K, Kobayashi S, Sugino K, Ito K. Substituting Potassium Iodide for Methimazole as the Treatment for Graves' Disease During the First Trimester May Reduce the Incidence of Congenital Anomalies: A Retrospective Study at a Single Medical Institution in Japan. *Thyroid*. 2015, 25(10):1155-61. doi: 10.1089/thy.2014.0581. 査読あり
 5. Watanabe N, Noh JY, Kozaki A, Iwaku K, Sekiya K, Kosuga Y, Matsumoto M, Suzuki M, Yoshihara A, Ohye H, Kobayashi S, Kunii Y, Mukasa K, Sugino K, Inoue T, Ito K. Radioiodine-Associated Exacerbation of Graves' Orbitopathy in the Japanese Population: Randomized Prospective Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015, 100(7):2700-8. doi: 10.1210/jc.2014-4542. 査読あり
- [学会発表](計 12 件)
1. Nomura M, Kobayashi S, Kurihara I, Miyashita K, Yokota K, Murai-Takeda A, Nakamura T, Morisaki M, Kohata N, Oshima Y, Minami Y, Saitoh K, Itoh H, Usefulness of Dexamethasone Suppression Test in the Diagnosis of Primary Aldosteronism Subtypes, 43rd Meeting of the International Aldosterone Conference, 2018
 2. Kohata N, Kurihara I, Kobayashi S, Yokota K, Mitsuishi Y, Morisaki M, Oshima Y, Koike Y, Saitoh K, Kameyama K, Itoh H, Adrenal Cysts with High Aldosterone Levels in Cystic Fluid: A Clinicopathological Study of 5 Adrenal Cyst Cases Using CYP11B2 Immunohistochemistry, 43rd Meeting of the International Aldosterone Conference, 2018
 3. Nakamura T, Kurihara I, Kobayashi S, Yokota K, Murai-Takeda A, Mitsuishi Y, Morisaki M, Kohata N, Oshima Y, Schutz G, Shibata H, Itoh H, Essential Role of Intestinal Epithelial Mineralocorticoid Receptor in the Regulation of Sodium Absorption and Blood Pressure, 26th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, 2016
 4. Morisaki M, Kurihara I, Kobayashi S, Yokota K, Murai-Takeda K, Jo R, Mitsuishi Y, Nakamura T, Kohata N, Oshima Y, Shibata H, Itoh H, MR Sensitivity is enhanced in High Fat Diet Mice under Equally-adjusted Salt Intake. The 26th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, 2016.
 5. Kobayashi S, Kurihara I, Yokota K, Murai-Takeda A, Mitsuishi Y, Nakamura T, Morisaki M, Kohata N, Oshima Y, Oguro S, Miyashita K, Itoh H, Shibata H, Itoh H, Cases of Aldosterone-producing Adenomas which were Cured by Radiofrequency Ablation: Ongoing Confirmatory Clinical Study for Efficacy and Safety. The 26th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, 2016.
 6. 栗原 勲, 大山 貴子, 小林 佐紀子, 横田 健一, 武田 彩乃, 三石 木綿子, 城 理絵, 中村 俊文, 盛崎 瑞葉, 柴田 洋孝, 伊藤 裕。原発性アルドステロン症の病態と内臓脂肪量の関連性の検討。第 34 回日本肥満症治療学会学術集会, 2016 年。
 7. 中村 俊文, 栗原 勲, 小林 佐紀子, 横田 健一, 武田 彩乃, 城 理絵, 三石 木綿子, 盛崎 瑞葉, 高畑 尚, 大嶋 洋佑, 伊藤 裕。腸管上皮ミネラルコルチコイド受容体は腸管 ENaC を介した Na 吸収により血圧を調節する。第 53 回日本臨床分子医学会学術総会, 2016 年。
 8. 盛崎 瑞葉, 栗原 勲, 小林 佐紀子, 横田 健一, 城 理絵, 武田 彩乃, 三石 木綿子, 中村 俊文, 高畑 尚, 伊藤 裕。高脂肪食負荷マウスの副腎におけるアルドステロン合成酵素発現の検討。第 88 回日本内分泌学会学術総会, 2015 年。
 9. Kobayashi S, Noh JY, Watanabe N, Yoshihara A, Kurihara I, Ito K, Itoh H, Effectiveness of Levothyroxine Therapy Targeting a Thyrotropin Level Lower than 2.5 mU/l during the First Trimester in Preventing Miscarriage: a Prospective Study at a Single Institution. The 15th International Thyroid Congress, 2015
 10. 中村 俊文, 栗原 勲, 城 理絵, 小林 佐紀子, 横田 健一, 武田 彩乃, 三石 木綿子, 盛崎 瑞葉, 高畑 尚, 伊藤 裕。新規ミネラルコルチコイド受容体(MR)結合因子 Evi1 は転写共役因子として MR 活性を調節する。第 38 回日本高血圧学会総会, 2015 年。
 11. 大嶋 洋佑, 栗原 勲, 宮下 和季, 小林 佐紀子, 横田 健一, 城 理絵, 門松 賢, 武田 彩乃, 小黒 草太, 宮嶋 哲, 亀山

香織, 伊藤 裕。複数の腫瘍がある PA における超選択的副腎静脈サンプリングの意義。第 25 回臨床内分泌代謝 Update, 2015 年。

12. 小林 佐紀子, 吉村 弘, 向笠 浩司, 國井 葉, 大江 秀美, 渡邊 奈津子, 松本 雅子, 吉原 愛, 栗原 勲, 伊藤 公一, 伊藤 裕。妊娠中のレボチロキシンナトリウムによる補充療法の妊娠転帰に与える影響。第 88 回日本内分泌学会学術総会, 2015 年。

〔図書〕(計 3 件)

1. 小林佐紀子、メディカル・サイエンス・インターナショナル、Hospitalist, 2016, p355-359
2. 小林佐紀子、文光堂、Medical Practice, 2016, p1723-1728
3. 小林佐紀子、伊藤裕、メディカルレビュー社、HORMONE FRONTIER GYNECOLOGY, 2015, p315-319

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 佐紀子 (KOBAYASHI, Sakiko)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・特任講師
研究者番号：80383727

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者
なし