

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21596

研究課題名（和文）腎臓細胞のエピゲノム記憶を用いた生活習慣病の統合的解明

研究課題名（英文）Integrative elucidation of lifestyle diseases using the epigenomic memory of kidney cells

研究代表者

藤田 敏郎（Fujita, Toshiro）

東京大学・先端科学技術研究センター・名誉教授

研究者番号：10114125

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：腎臓近位尿細管のマーカーとなるDNAメチル化を同定した。尿沈渣中の近位尿細管マーカーのDNAメチル値は、落下近位尿細管を反映すると考えられ、腎機能が悪化している糖尿病患者の層別化に有用であることが示された。また、糖尿病性腎症患者の腎臓組織に生じるDNAメチル化異常を明らかにした。糖尿病による腎臓DNAメチル化異常は、メモリーされて後年の腎障害進展に関与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAメチル化解析が腎疾患の診断に有用であることを本研究ははじめて明らかにした。研究結果は今後のエピジェネティック尿検査に先鞭をつける内容である。また、純化した細胞を腎臓のDNAメチル化解析に用いた結果、糖尿病性腎症で生じている腎臓細胞のフェノタイプ変化の元となるエピジェネティック異常を同定することができた。分子機構の一端が明らかにされ、今後の治療法開発の基盤となる。

研究成果の概要（英文）：We identified CpG sites, methylation of which can be used as the markers of renal proximal tubules. DNA methylation values of proximal tubule markers in the urine sediments were likely to reflect the proximal tubules exfoliated into the urine and improved the ability to stratify diabetic patients with deteriorating renal function. The study also revealed abnormal DNA methylation in renal tissues of patients with diabetic nephropathy. Aberrant DNA methylation caused by diabetes seems to underly the development of renal damage in later years.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：エピジェネティクス 高血圧 糖尿病性腎症 集合管 近位尿細管 尿中マーカー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

高血圧と糖尿病性腎症は暴露された環境因子の影響が体に記憶され発症に至る。環境因子の刺激が臓器に蓄積する分子機構にはエピジェネティクスが深く関与し、DNAメチル化レベルのエピゲノム記憶は、臓器特異的な遺伝子発現や発がんなどに影響する。これまで申請者は腎臓集合管間在細胞に発現するPendrinが血圧調節に関わることを解明してきた。また、糖尿病において腎臓のDNAメチル化が腎症の進行に関わることをマウスモデルにて示してきた。一方、ヒトの腎臓での解析は報告が限られており、本研究で検討を加えることとした。

## 2. 研究の目的

本研究は、腎臓細胞のDNAメチル化の解析によりエピジェネティックな側面から生活習慣病の発症機構を解明し、新たな診断・治療シーズを提示することを目的とした。腎臓細胞のエピゲノム記憶が高血圧及び慢性腎臓病の進展に関わる機序の解明をエピジェネティック機構の側面から試みた。

腎臓は多細胞から構成される臓器であるうえ、糖尿病性腎症を初めとする腎疾患では炎症性細胞の浸潤や線維芽細胞の増殖が大きく臓器全体のDNAメチル化に影響を与える。そこで本研究では、構成細胞を純化して構成細胞固有のDNAメチル化を同定すること、糖尿病性腎症生検から近位尿細管細胞を純化して腎機能悪化・高血圧を惹起する可能性のある異常DNAメチル化を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

腎臓内構成細胞ごとのDNAメチル化マーカーの同定と診断への応用  
腎がんのために摘出された腎臓の正常部分から、レーザーマイクロダイセクションにより、近位尿細管、皮質、髄質内層分画などを採取した。イルミナ社 Infinium EPIC methylation kit により、網羅的にDNAメチル化値を求め、既存のデータベースと比較し、近位尿細管、皮質、髄質内層のマーカーとなるDNAメチル化部位を同定した。糖尿病患者尿沈渣中の近位尿細管特異的DNAメチル化値をパイロシーケンス法により解析し、eGFR、eGFR変化、尿アルブミン値などの臨床パラメーターと関連性を解析した。さらに、尿中DNAメチル化値によるeGFRが悪化する患者の層別化能をROC曲線、NRI、IDIでeGFR、尿アルブミン値をはじめとするこれまでに指摘された危険因子との組み合わせで比較した。

糖尿病の腎臓エピジェネティック異常の解明 - メタボリックメモリーへの関与 -  
ヒト糖尿病性腎症のDNAメチル化異常の解明：糖尿病性腎症患者の腎症生検組織から、腎臓構成成分をダイセクションにより分取した。Infinium EPIC キットにより網羅的に解析し、健常腎臓組織と比較し、腎症の異常DNAメチル化を抽出した。さらに、代表的な遺伝子をパイロシーケンス法で検証した。eGFRと関連のある異常DNAメチル化を呈する遺伝子のなかに、腎機能悪化に関わるものが含まれると考えられるため、糖尿病による異常DNAメチル化について、eGFR値との関連性を検討した。

## 4. 研究成果

腎臓内構成細胞ごとのDNAメチル化マーカーの同定と診断への応用  
網羅的なDNAメチル化解析の結果、ヒト腎臓近位尿細管細胞では、SMTNL2とG6PCの遺伝子領域に選択的に低メチル化値をとるCpGがあることが明らかになった。尿沈渣中のSMTNL2とG6PCのメチル化レベルは、傷害により剥離した近位尿細管細胞の割合を反映していると考えられ、互いによく相関していた。また、尿沈渣中のSMTNL2のメチル化レベルは、推定糸球体濾過量の年間減少量と有意に相関した。さらに、既知の危険因子を含むモデルに尿中のSMTNL2のメチル化を加えると推定糸球体濾過率の低下が速い糖尿病患者の識別がより有効にできることが明らかになった(BMJ Open Diabetes Res Care. 8 (1), e001501, 2020)。本研究により、腎機能の低下が続く糖尿病患者の層別化に尿中DNAメチル化解析が有用であることが示され、今後のエピジェネティック尿検査の分野の発展が期待できる。

糖尿病の腎臓エピジェネティック異常の解明 - メタボリックメモリーへの関与 -  
11例の糖尿病性腎症の近位尿細管と正常腎臓9例のDNAメチル化値をイルミナ社 EPIC methylation kit による網羅的解析により比較し、糖尿病によって腎臓に生じるDNAメチル化異常を抽出した。その結果、線維化因子、酸化ストレス因子に脱メチル化がみられ、腎症進展に関わりが考えられる遺伝子のDNAメチル化異常が見いだされた。さらに、高血圧発症に関わるとされる遺伝子の脱メチル化もみられ、糖尿病に高血圧が合併する要因になる可能性が考えられた。一方、複数の腎臓保護因子にDNAメチル化の増加がみられ、保護因子の発現減少が持続し腎障害の悪化に関わると考えられた。主な遺伝子について、COBRA法、パイロシーケンス法によってDNAメチル化異常の検証を行った。見出したDNAメチル化異常の中に、組織採取時のeGFR値と関連する遺伝子があり、この中に腎機能悪化に関わる遺伝子が含まれると考えられた。これ

までに白血球の DNA メチル化異常が、糖尿病性腎症の発症に関わることが示されているが、腎臓の DNA メチル化異常については不明な点が多く残されていた。本研究により、腎臓 DNA メチル化の腎障害進展への関与の可能性が示された。今後は本研究結果を基盤に、動物実験などによる因果関係の証明が必要になる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hirohama Daigoro, Nishimoto Mitsuhiro, Ayuzawa Nobuhiro, Kawarazaki Wakako, Fujii Wataru, Oba Shigeyoshi, Shibata Shigeru, Marumo Takeshi, Fujita Toshiro	4. 巻 78
2. 論文標題 Activation of Rac1-Mineralocorticoid Receptor Pathway Contributes to Renal Injury in Salt-Loaded Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 82～93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17263	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawarazaki Wakako, Fujita Toshiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Role of Rho in Salt-Sensitive Hypertension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2958～2958
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22062958	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Marumo T, Hoshino J, Kawarazaki W, Nishimoto M, Ayuzawa N, Hirohama D, Yamanouchi M, Ubara Y, Okaneya T, Fujii T, Yuki K, Atsumi Y, Sato A, Arai E, Kanai Y, Shimosawa T, Fujita T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Methylation pattern of urinary DNA as a marker of kidney function decline in diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open Diabetes Res Care .	6. 最初と最後の頁 e001501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bmjdr-2020-001501.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ayuzawa N, Fujita T.	4. 巻 32
2. 論文標題 The Mineralocorticoid Receptor in Salt-Sensitive Hypertension and Renal Injury.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Am Soc Nephrol.	6. 最初と最後の頁 279-289
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1681/ASN.2020071041.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawarazaki W, Fujita T.	4. 巻 17
2. 論文標題 Kidney and epigenetic mechanisms of salt-sensitive hypertension.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat Rev Nephrol.	6. 最初と最後の頁 350-363.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41581-021-00399-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 丸茂丈史、星野純一、山内真之、乳原善文、河原崎和歌子、西本光宏、鮎澤信宏、広浜大五郎、藤田敏郎.
2. 発表標題 糖尿病性腎症に生じたメタボリックメモリー関連遺伝子のDNAメチル化異常.
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鮎澤 信宏、広浜 大五郎、西本 光宏、河原崎 和歌子、丸茂 丈史、藤田 敏郎 .
2. 発表標題 アルドステロン過剰時のPendrin制御と $\beta$ -ケトグルタル酸
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 広浜 大五郎、西本 光宏、鮎澤 信宏、河原崎 和歌子、大庭 成喜、丸茂 丈史、藤田 敏郎 .
2. 発表標題 ポドサイトRac1-ミネラルコルチコイド受容体(MR)系活性化は糖尿病性腎臓病進展に寄与する .
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河原崎 和歌子, 水野 理介, 西本 光宏, 鮎澤 信宏, 広浜 大五郎, 大庭 成嘉, 丸茂 丈史, 藤田 敏郎.
2. 発表標題 加齢に伴う食塩感受性高血圧発症における腎血管性機序の検討
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 広浜 大五郎, 西本 光宏, 鮎澤 信宏, 河原崎 和歌子, 大庭 成喜, 丸茂 丈史, 藤田 敏郎.
2. 発表標題 新たな糖尿病性腎臓病モデルの開発とミネラルコルチコイド受容体の関与の解明.
3. 学会等名 第56回高血圧関連疾患モデル学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鮎澤信宏
2. 発表標題 アルドステロン過剰におけるアルカローシス依存性のPendrin制御機構の解析.
3. 学会等名 第15回Vascular Biology Innovationに関する研究助成発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河原崎和歌子
2. 発表標題 加齢に伴う高血圧発症機序の解明～食塩の関与～
3. 学会等名 第15回Vascular Biology Innovationに関する研究助成発表会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河原崎和歌子
2. 発表標題 加齢に伴う高血圧発症機序の解明～食塩の関与～
3. 学会等名 CVMW2020、血管生物シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田敏郎
2. 発表標題 「食塩、高血圧と私」、Homer Smith Award受賞記念講演
3. 学会等名 第9回臨床高血圧フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河原崎和歌子，鮎澤信宏，大庭成喜，藤田敏郎
2. 発表標題 加齢に伴う高血圧発症機序の解明～食塩の関与～
3. 学会等名 第67回日本腎臓学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鮎澤信宏，河原崎和歌子，大庭成喜，藤田敏郎
2. 発表標題 「MRを介した間在細胞 pendrinの制御機構」
3. 学会等名 第67回日本腎臓学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田敏郎
2. 発表標題 「ライフコースにおける食塩感受性高血圧の発症機序」
3. 学会等名 第43回日本高血圧学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河原崎和歌子
2. 発表標題 「加齢に伴う高血圧発症機序の解明～食塩の関与～」
3. 学会等名 第43回日本高血圧学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河原崎和歌子
2. 発表標題 「加齢に伴う高血圧発症機序の解明と新規治療法の開発」
3. 学会等名 第25回日本心血管内分泌代謝学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鮎澤信宏
2. 発表標題 「腎臓におけるMRを介した間在細胞pendrinの制御機構とその意義」
3. 学会等名 第25回日本心血管内分泌代謝学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 鮎澤信宏
2. 発表標題 「ミネラルコルチコイド受容体を介した間在細胞pendrinの制御機構」
3. 学会等名 第25回日本心血管内分泌代謝学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河原崎 和歌子, 鮎澤 信宏, 広浜 大五郎, 西本 光宏, 大庭 成喜, 丸茂 丈史, 藤田 敏郎.
2. 発表標題 Klotho 減少は高カリウム血症の原因となりうる
3. 学会等名 第67回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 広浜 大五郎, 西本 光宏, 鮎澤 信宏, 河原崎 和歌子, 藤井 航, 大庭 成喜, 柴田 茂, 丸茂 丈史, 藤田 敏郎
2. 発表標題 Rac1 - ミネラルコルチコイド受容体系活性化は糖尿病性腎臓病進展に寄与する
3. 学会等名 第67回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸茂丈史
2. 発表標題 エピジェネティック情報を用いた糖尿病性腎症の病態解明と診断法開発
3. 学会等名 第11回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸茂丈史
2. 発表標題 エピジェネティクス情報を用いた生活習慣病の病態解明と診断法開発
3. 学会等名 第146回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 鮎澤信宏	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 70
3. 書名 医学のあゆみ278巻4号 TOPICS腎臓内科学 ミネラルコルチコイド受容体によるpendrin活性化	

1. 著者名 河原崎和歌子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 ライフメディコム	5. 総ページ数 107
3. 書名 カレントセラピー39巻12号 難治性高血圧Up-to-date 2021 診療と最新治療 食塩感受性と加齢による昇圧機序	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 腎機能の評価方法および糖尿病患者における腎機能が低下した患者の判別方法	発明者 丸茂丈史、藤田敏郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-150726	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

アルドステロンと高血圧～腎尿細管ナトリウム輸送体の活性化機構～  
[https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/report/page\\_01218.html](https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/report/page_01218.html)  
 高血圧とエビジェネテイクス～食塩と腎臓の役割～  
[https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/report/page\\_00040.html](https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/report/page_00040.html)  
 鮎澤信宏特任助教が2021年度高峰謙吉研究奨励賞を受賞  
[https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/report/award\\_20211215.html](https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/report/award_20211215.html)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	丸茂 丈史  (Marumo Takeshi)  (70265817)	国際医療福祉大学・医学部・教授   (32206)	
研究分担者	鮎澤 信宏  (Ayuzawa Nobuhiro)  (50459517)	東京大学・先端科学技術研究センター・特任助教   (12601)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	河原崎 和歌子  (Kawarazaki Wakako)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関