

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590879

研究課題名（和文） エピジェネティック異常を標的とした新規慢性腎臓病治療法の開発

研究課題名（英文） Studies of epigenetic abnormalities in chronic kidney disease as a novel therapeutic target

研究代表者

丸茂 文史 (Marumo Takeshi)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任講師

研究者番号：70265817

研究成果の概要（和文）：エピジェネティック機構は、遺伝子スイッチとして作用する。臓器障害がおきると、構成細胞の性質が変わり、正常な働きをしなくなる。本研究により、慢性腎臓病でみられる腎臓の線維化反応や炎症にエピジェネティック機構が関与することが示された。腎臓でのエピジェネティック異常を予防、治療することが新たな慢性腎臓病の治療になる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Epigenetic mechanisms act like a switch of gene activation. Organ dysfunction is characterized by altered phenotype of each components of the affected organ. The present study revealed that epigenetic mechanisms are involved in the development of phenotype switch such as fibrotic and pro-inflammatory changes of the kidney cells, observed in chronic kidney disease. Epigenetic abnormalities can be a novel target for the chronic kidney disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病、糖尿病性腎症、ヒストン脱アセチル化酵素、DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

わが国の透析人口は平成 21 年には 27 万人に達し、透析医療費は年間 1 兆円を超える。さらに、慢性腎臓病は心血管病リスク因子でもある。糖尿病性腎症と高血圧による腎硬化

症は透析導入原因疾患の約 70% を占め、いずれも治療にもかかわらず炎症・線維化が持続し、腎障害が進行してしまうという問題がある。腎臓の炎症や線維化がなぜ持続するのか明らかにでき、それに対する治療が開発でき

ると大きく慢性腎臓病に対する医療状況を改善できる。

大規模臨床試験 UKPDS の経過観察研究で、2 型糖尿病患者に対する早期血糖コントロールの心血管保護効果は 10 年以上にわたり継続することが示された(N Engl J Med 359: 1565-1576, 2008)。この「メタボリックメモリー」の成立機序にエピジェネティック異常が関与することが明らかになった。高血糖環境で血管内皮・平滑筋細胞を培養すると、その後正常環境に戻しても NF- κ B 活性化と炎症性サイトカイン産生が持続する。炎症の持続はエピジェネティック状態を規定するヒストンのメチル化とアセチル化に異常が生じ過去の高血糖が記憶されることによる。エピジェネティック状態はヒストン修飾とともに DNA メチル化により決定される。高血糖や炎症などの誘発要因がエピジェネティック異常を引き起こし、それに基づく細胞の形質変化は細胞分裂のときにも複製されて記憶に残り、進行性の病態を生じさせることが次第に明らかになってきている。しかし、糖尿病や高血圧で腎臓に生じるエピジェネティック異常は未だ不明であった。

2. 研究の目的

本研究では糖尿病性腎症、尿管結紮、高血圧などのモデルを用いて、腎臓病でヒストン修飾、DNA メチル化に異常が生じるかどうかを明らかにすることを目的とした。異常が生じるならば、どのようにしてエピゲノムが変化するのか、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を中心にしてエピジェネティック状態を制御する修飾酵素の変化を解析することとした。

さらに、エピジェネティック異常を変化させることが腎臓病を改善できるかどうかを調べるために、慢性腎臓病モデルに対して HDAC 阻害薬が有効であることを調べることとした。申請者らは、HDAC 阻害薬トリコスタチン A が尿細管細胞の Epithelial-mesenchymal transition を著明に抑制することを示した(J Am Soc Nephrol 18: 58-67, 2007)。この *in vitro* の所見は、HDAC 阻害が慢性腎臓病の不可逆性の一因となる尿細管細胞の形質転換を抑制しうることを示しており、本所見をモデル動物を用いてさらに詳しく調べることにした。さらに、HDAC 阻害が線維化マーカーや炎症性物質などのエピジェネティック異常を改善するかどうか検討することとした。

3. 研究の方法

1) 尿細管間質障害モデルの一側尿管結紮 (UUO) を用いた解析

UUO は既報の方法 (Eur J Pharmacol 2007 Marumo et al) に従い、8 週令 C57Bl6 オスマ

ウス左尿管を結紮し、3、10 日後の腎臓を摘出する。これらの腎臓病モデルでは線維化に伴って、障害腎のヒストンアセチル化がコントロールの 50%以下まで著明に減少し、一方 HDAC1、HDAC2 の蛋白量が各々 $33 \pm 13\%$ 、 $53 \pm 13\%$ 有意に増加するという結果を報告している (Am J Physiol 2010 Marumo et al)。本研究ではさらにヒストンアセチル化酵素、メチル化酵素の発現変化を real time RT PCR 法を用いて調べた。

さらに、新たに HDAC 阻害作用がその薬理作用として注目されているバルプロ酸が、UUO でみられる腎臓尿細管間質障害に対して有効であるかどうか検討した。バルプロ酸は飲水に混じて投与し、腎臓はマッソントリクローム染色などを用いて組織学的に検討を加えた。また、炎症・線維化関連遺伝子発現は mRNA レベル、タンパクレベルについて検討を加えた。さらに、尿細管細胞 NRK52E 細胞を培養し、TNF- α や TGF- β などの障害因子で刺激し、ケモカイン発現や線維化因子発現を増加させ、その増加に対するバルプロ酸の効果を検討した。

2) 糖尿病腎症モデルを用いた解析

糖尿病性腎症モデルには db/db マウスを用いた。db/db マウスは 5 週令から高血糖と肥満を呈しはじめ、やがてアルブミン尿および腎臓組織変化を生じる。本研究では 10 週令雄性 db/db マウスを用いて検討をおこなった。

ヒストンアセチル化の変化と HDAC 阻害薬の効果の検討を 1) と同様に行った。また、糖尿病性腎症は進行性の病態を呈することから、本モデルではヒストン修飾よりもさらに安定的と考えられる DNA メチル化レベルでの異常が生じていないかどうか検討を加えた。

DNA メチル化については、db/+を対照に、db/db マウスの腎臓 mRNA 発現変化が生じる遺伝子をスクリーニングし、約 30 個の候補遺伝子を選定した。各遺伝子について COBRA 法によって DNA メチル化の変化の有無を解析した。さらに腎臓細胞を FACS によって近位尿細管細胞とその他の分画にわけ、各集団での解析も行った。

3) エピジェネティック修飾因子の検討:

gadd45beta の抗線維化作用

尿細管間質障害や糖尿病性腎症によって DNA メチル化やヒストン修飾変化が生じることが明らかになったため、何がこうした異常を生じさせるのか明らかにするために、エピジェネティック修飾因子の発現変化について検討を加えた。ヒストンメチル化酵素、脱メチル化酵素、DNA メチル化酵素、脱メチル化関連分子などの mRNA 発現を、各モデルで検討した。さらに、変化のみられた

gadd45beta については、培養ヒト近位尿細管細胞を用いて、何が誘導の刺激になっているかについての検討を行った。また、siRNA を用いて病態で果たしている機能についてスクリーニングを行った。

4. 研究成果

1) 尿細管間質障害モデルの一侧尿管結紮 (UUO) を用いた解析

UUO では障害腎のヒストンアセチル化が減少するが、バルプロ酸はこれを有意に抑制することが明らかになった。障害腎では線維化の進行に伴い collagen 1a, alpha SMA mRNA が増加し、炎症反応を示すマクロファージマーカー F4/80 mRNA が増加する。バルプロ酸はこれらの分子の誘導を有意に低下させた。マッソントリクローム染色上、障害によって腎臓の線維化が確認できるが、バルプロ酸によって抑制される傾向を示した。障害腎では腎保護物質 BMP7 が減少する障害腎で低下した BMP-7 の発現はバルプロ酸によって増加する傾向がみられた。

培養尿細管細胞を用いた検討で、バルプロ酸は BMP-7 の発現を著明に増加させることが明らかになった。一方、マクロファージ浸潤に関与すると考えられるケモカイン CSF-1 の誘導は有意に抑制した。これらのバルプロ酸の作用は構造の異なる HDAC 阻害薬トリコスタチンとほぼ同一であり、バルプロ酸は HDAC 阻害作用を介して効果を発揮していると考えられた。以上の検討から、臨床的に用いられているバルプロ酸は HDAC 阻害作用を介して、尿細管細胞に働き、抗炎症ならびに抗線維化作用を発揮して腎臓尿細管間質障害を抑制することが示唆された。

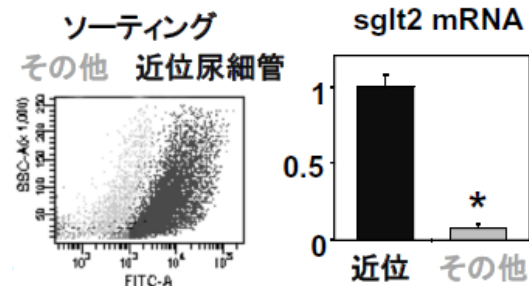
2) 糖尿病腎症モデルを用いた解析

db/db マウスでは、腎臓全体のアセチルヒストン量、HDAC アイソザイムなどに変化はなかった。また、UUO に対しては有効であったバルプロ酸は、db/db マウスにみられる尿アルブミン増加に対して抑制効果はなく、db/db マウスの腎臓で発現が上昇する nox4 mRNA などの遺伝子発現に対して抑制効果はなかった。db/db マウスでみられる腎障害に対しては HDAC 阻害薬バルプロ酸の有効性は示すことはできなかった。

アセチルヒストンレベルでの変化をとらえることはできなかったが、引き続き DNA メチル化の変化について、検討を進めた。その結果、db/db マウスでは腎臓全体で nox4 mRNA 発現の上昇に伴って、遺伝子の body で有意な DNA 脱メチル化が生じていることが明らかになった。mRNA 発現に関わると考えられるプロモーター領域でも同様な脱メチル化が確認された。

DNA メチル化は臓器ごとにまったく異なる

ことが知られている。腎臓の構成細胞間でも差があることが予想された。そこで近位尿細管とそれ以外の分画をソーターでわけて解析することとした。近位尿細管マーカーとして知られる Lotus tetragonolobus lectin を用いて陽性分画と陰性分画にわけて各々の mRNA 発現を比較した。その結果、sglt2, AQP7 などの近位尿細管マーカーとして知られる分子は陽性分画に、一方 NKCC2 など他の部位に発現している遺伝子は陰性分画に enrich していることが確認できた。



これらの分画を用いて nox4 の DNA メチル化を解析したところ db/+, db/db マウスともに近位尿細管細胞の nox4 遺伝子は 10%以下と低メチル状態である一方、非近位尿細管分画では 50%以上の高メチル状態であり、DNA メチル化が近位尿細管特異的な発現をコントロールしていると考えられた。重要なことに、db/db マウスでは、db/+に比して非近位尿細管での nox4 promoter DNA のメチル化が減少していた。

以上の検討から、糖尿病性腎症で腎臓全体の nox4 DNA のメチル化が減少し遺伝子発現が上昇していることが明らかになった。DNA の脱メチル化は非近位尿細管で生じておりこの部位での nox4 DNA 脱メチル化は、本来発現が低い非近位尿細管での nox4 mRNA の増加に関与し、酸化的ストレスの増加を介して腎症進展に関わる可能性が示唆された。

さらに検討を進めて nox4 以外にも DNA メチル化異常を生じている遺伝子を解明し、また、糖尿病のどの要因によってこのようなメチル化異常が生じているのか解明を進めていく予定である。本研究によりそれに向けた基盤が整備できたと考えている。

3) エピジェネティック修飾因子の検討 : gadd45beta の抗線維化作用

尿細管間質障害や糖尿病性腎症で生じるエピジェネティック修飾関連分子のスクリーニングの結果、UUO および、虚血再還流モデルでストレス応答蛋白 gadd45beta が上昇することが明らかになった。gadd45beta は DNA の脱メチル化反応を引き起こすことが報告されている (Cell. 2008 135:1201-12)。障害腎で gadd45beta mRNA 発現は UUO モデルで約

4 倍に、虚血再還流モデルで 2.7 倍に上昇した ($p < 0.01$)。

次に何が gadd45beta 増加の要因になっているか明らかでなかったため、各種障害因子で培養尿管細胞を刺激して検討した。その結果、TGF- β が gadd45beta を誘導することが明らかになった。gadd45beta の機能について検討を加えるため、gadd45beta に対する siRNA を処置すると、collagen 1a mRNA の発現が 60-70%増加する ($p < 0.01$) ことから、gadd45beta は抗線維化作用を持つと考えられた。さらに、gadd45beta のノックダウンは TGF- β による collagen 1a mRNA 増加を増強した。以上の結果から gadd45beta は腎障害の初期に TGF- β などの刺激によって誘導される内因性の抗線維化因子であると思われた。

抗線維化作用が TGF- β シグナルのどの段階で生じ、そこに DNA メチル化変化が関与しているかどうかについて現在検討を進めている。本研究によって、gadd45beta が腎障害を抑制する因子であることが明らかになったが、薬物によって腎臓特異的に gadd45beta を誘導することができれば、新たな腎臓病治療法の開発につながると考えられた。

4) 総括

本研究により、バルプロ酸が HDAC 阻害作用を介して腎臓の線維化に抑制的に働くことが明らかになった。HDAC 阻害薬が抗線維化作用をもつことは、ほかのグループからも複数の報告がなされている。従来の HDAC 阻害薬は特異性の低いものであったが、最近はいソザイム特異的に効くものが開発されてきている。今後は各病態・病期に関わる HDAC アイソザイムを明確にし、それに対して特異性の高い HDAC 阻害薬の効果を確認していくことにより精度の高い治療法の開発につながっていくと思われる。

糖尿病性腎症では、nox4 遺伝子特異的に DNA メチル化変化が生じていることが明らかになった。DNA メチル化の変化は、遺伝子発現変化の安定性に関わり、病態の進行性を寄与するのではないかと予想される。今後は、さらにほかの遺伝子についての検討を進めたい。当該 DNA メチル化異常とそれに伴う遺伝子発現異常が実際に病態進展に関与するかどうか証明する必要がある。そのうえで、DNA メチル化異常の生じるメカニズムを明らかにすること重要である。このようなアプローチによって、腎臓障害の進行を阻止あるいは、reverse するような新たな治療法の手掛かりが得られるのではないかと考えている。

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 2 件)

①丸茂丈史、腎臓疾患におけるエピジェネティックスの意義、腎と透析、査読なし、Vol 69, No3, 2010, 363-367

②Mu S, Shimosawa T, Ogura S, Wang H, Uetake Y, Kawakami-Mori F, Marumo T, Yatomi Y, Geller DS, Tanaka H, Fujita T Epigenetic modulation of the renal β -adrenergic-WNK4 pathway in salt-sensitive hypertension. Nat Med. 2011;17(5):573-80 査読あり doi: 10.1038/nm.2337

[学会発表] (計 7 件)

①丸茂丈史、腎臓にかかわる細胞特異的なエピジェネティック異常、第 56 回日本腎臓学会学術総会 (招待講演)、2013 年 05 月 12 日、東京国際フォーラム (東京都)

②丸茂丈史、糖尿病性腎症にみられる nox4 DNA 脱メチル化、第 126 回 日本薬理学会関東部会、2012 年 07 月 14 日、北里大学薬学部 (東京都)

③丸茂丈史、gadd45beta は TGF- β で誘導され抗線維化作用をもつ、第 55 回日本腎臓学会学術総会、2012 年 06 月 02 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

④丸茂丈史、糖尿病性腎症にみられる nox4 DNA メチル化異常、第 34 回日本高血圧学会総会、2011 年 10 月 22 日、栃木総合文化センター (栃木県)

⑤丸茂丈史、糖尿病性腎症にみられる DNA メチル化異常、第 54 回日本腎臓学会学術総会、2011 年 6 月 17 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑥丸茂丈史、TGF- β で誘導される gadd45beta のもつ腎臓抗線維化作用、第 10 回日本再生医療学会総会、平成 23 年 3 月 1 日、京王プラザホテル (東京都)

⑦丸茂丈史、バルプロ酸は HDAC 阻害作用を介して尿細管間質障害を改善する、第 53 回日本腎臓学会学術総会、平成 22 年 6 月 18 日、神戸国際会議場 (兵庫県)

[図書] なし

[産業財産権]

○出願状況 なし

○取得状況 なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.c-epi.rcast.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸茂 丈史 (Marumo Takeshi)
東京大学・先端科学技術研究センター・
特任講師
研究者番号 : 70265817

(2) 研究分担者

平橋 淳一 (Hirahashi Junichi)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号 : 70296573