

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659410

研究課題名(和文)糖尿病性腎症と食塩感受性高血圧の共通基盤におけるエピジェネティック制御機構

研究課題名(英文)Epigenetic mechanisms underlying renal derangement in hypertension and diabetes

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・特任研究員、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) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病には高血圧を合併することが多いがその分子基盤は不明な部分が多い。糖尿病と血圧異常を呈するモデルで腎臓内エピジェネティック状態に不具合が生じていないかどうか検討した。

正常マウスの腎臓を近位尿細管とそれ以外の分画にわけて解析し、腎臓内の部位特異的にDNAメチル化状態が異なる血圧調節因子を複数見出した。つぎに食塩負荷で高血圧を呈する糖尿病マウスdb/dbを用いて高血圧原因候補遺伝子のメチル化解析を行った。正常マウスと比べ、複数の血圧関連分子にDNAメチル化異常が認められた。mRNAレベルでもそれに並行して発現が変化しており、エピジェネティック異常が発現異常の元にあることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Diabetes is often complicated with hypertension, but the underlying mechanisms have not been clarified. We investigated whether epigenetic derangement in the kidney underlies hypertension in diabetic model animals.

Because kidney is composed with multiple cell types, we sorted proximal tubule cells and investigated the differential DNA methylation status. In normal mice, DNA methylation of multiple genes including those involved in blood pressure regulation was selectively demethylated in proximal tubules. In db/db mice, diabetic mice with salt sensitive hypertension, aberrant DNA methylation and mRNA changes were detected in some of the genes related to blood pressure regulation. These results suggest that epigenetic abnormalities may underlie hypertension in diabetes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：糖尿病性腎症 高血圧 食塩 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

エピゲノム制御は酸化ストレスをはじめ多くの液性因子により影響を受け、数多くの遺伝子発現に影響を及ぼす。実際、我々は食塩感受性高血圧の発症、進展に遺伝子異常にくわえ、腎臓尿細管におけるエピゲノム制御の異常と核内受容体の活性化が関与することを報告した(Nagase et al Nat Med 2008, Shibata et al J Clin Invest 2011, Wu et al Nat Med 2011)。また、腎臓では虚血後の細胞再生、線維化、におけるエピゲノム制御の異常の関与を報告してきた(Imai et al Stem Cells 2007, Marumo et al J Am Soc Nephrol 2008, Marumo et al Am J Physiol 2010)。

一方、メタボリックシンドロームでは食塩感受性が高いことがヒトの研究から良く知られている。エピゲノム異常がメタボリックシンドロームでの食塩感受性の元に存在する可能性が考えられ、本研究ではモデル動物および培養細胞を用いて検討を加えた。

2. 研究の目的

生活習慣病、特に高血圧と糖尿病はその発症に相互に関連があり、かつ心血管イベントのリスクとなる疾患の臓器障害進展にエピゲノム制御が共通の基盤となっていることが考えられた。本研究ではエピジェネティック機構すなわち、ヒストン修飾並びに、マイクロ RNA および DNA メチル化が糖尿病性腎症と食塩感受性高血圧発症において異常をきたしているかどうか明らかにすることを目的とした。

最初に正常状態でのエピゲノムを明確にし、疾患によってエピゲノムが変化する疾患関連遺伝子を明らかにし、その役割を解明することを目指した。

3. 研究の方法

正常マウスを用いて食塩感受性や線維化に関わる遺伝子のエピゲノム状態をまず評価した。続いて糖尿病腎症モデルマウスとして db/db を用い、腎症初期に発現変化する遺伝子を対象に腎臓全体とともにソーティングによって分取した腎臓構成細胞ごとにヒストンアセチル化異常を Western blot 法並びに DNA メチル化の異常を COBRA 法を用いてスクリーニングした。

さらに、尿細管細胞を培養し、塩分感受性や線維化反応関連の遺伝子のなかで、ヒストン修飾や DNA メチル化、microRNA によるエピジェネティック制御の対象となっている標的遺伝子の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) 正常マウス腎臓の近位尿細管細胞と遠位尿細管を含むその他の分画との分別
エピゲノムは細胞によって異なる。腎臓は多数の構成細胞からなるため、最も細胞数の多

い近位尿細管細胞とその他の分画に分けて解析を進めることとした。腎臓を単細胞にわけて近位尿細管マーカーで染色したのちにソーターを用いて分別を行った。ナトリウム吸収に関わる NKCC2, NCC, ENaC などの遺伝子は、その他の分画に含まれる一方 Sgl t2 などは近位尿細管分画に濃縮されており、分別がうまくなされていることが確認できた。

(2) 腎臓内の部位特異的 DNA メチル化

分取した分画ごとに DNA メチル化を解析したところ、近位尿細管に選択的に脱メチル化している遺伝子や逆に非近位尿細管で脱メチル化しているものも得られた。その中には血圧を制御することが知られる遺伝子が複数含まれていた。脱メチル化している遺伝子の発現を RT-qPCR で調べると高い傾向が認められ、腎臓内でも臓器間と同様に DNA メチル化が異なり、エピゲノムによる発現の制御がなされていることが明らかになった。

(3) 糖尿病マウスでの異常 DNA メチル化

近位尿細管分画に着目し、糖尿病モデル db/db マウスと正常マウスの比較を行った。その結果、血圧調節に関与が示唆されるものをふくめて複数の遺伝子に異常メチル化が生じ、かつ発現が変化していることが明らかになった。

(4) 培養細胞を用いた検討

上記で抽出されたエピジェネティック変化がみられた遺伝子が発現の制御を受けるかどうかについて、培養細胞を用いて検討を加えた。HDAC 阻害薬、DNA メチル化阻害薬を加えると複数の候補遺伝子で発現が変化し、これらの遺伝子はエピゲノム変化が発現変化に関わっていることが考えられた。

(5) マイクロ RNA についての検討

高血圧と糖尿病による腎障害は進行するといずれも線維化に陥るという共通点がある。線維化反応をはじめとして腎障害には microRNA が関わるということが明らかになってきているが microRNA 標的遺伝子の予測は microRNA と標的遺伝子 mRNA の配列の不完全な一致のため困難である。線維化反応へ関わる Zeb-2 遺伝子に着目して、特定の遺伝子を標的とする microRNA を網羅的に同定する新しい手法を報告した(Oba et al BMC Res Notes 2013)。

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 11 件)

1. Fujita T. 2014. Mechanism of Salt-Sensitive Hypertension: Focus on Adrenal and Sympathetic Nervous Systems. J Am Soc Nephrol. in press 2014. doi

10.1681/ASN.2013121258 査読あり

2. Yamamoto, T., Izumi-Yamamoto, K., Iizuka, Y., Shirota, M., Nagase, M., Fujita T., and Gotoda, T. 2013. A novel link between Slc22a18 and fat accumulation revealed by a mutation in the spontaneously hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun* 440:521-526. doi 10.1016/j.bbrc.2013.09.096 査読あり

3. Fujita, M., and Fujita T. 2013. The role of CNS in salt-sensitive hypertension. *Curr Hypertens Rep* 15:390-394. doi 10.1007/s11906-013-0358-z 査読あり

4. Kawarazaki, W., and Fujita T. 2013. Aberrant Rac1-mineralocorticoid receptor pathways in salt-sensitive hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 40:929-936. doi 10.1111/1440-1681.12177 査読あり

5. Jimbo, R., Kawakami-Mori, F., Mu, S., Hirohama, D., Majtan, B., Shimizu, Y., Yatomi, Y., Fukumoto, S., Fujita T., and Shimosawa, T. 2013. Fibroblast growth factor 23 accelerates phosphate-induced vascular calcification in the absence of Klotho deficiency. *Kidney Int.* doi 10.1038/ki.2013.332 査読あり

6. Oba, S., Mizutani, T., Suzuki, E., Nishimatsu, H., Takahashi, M., Ogawa, Y., Kimura, K., Hirata, Y., and Fujita T. 2013. A useful method of identifying of miRNAs which can down-regulate Zeb-2. *BMC Res Notes* 6:470. doi 10.1186/1756-0500-6-470 査読あり

7. Ogura, S., Shimosawa, T., Mu, S., Sonobe, T., Kawakami-Mori, F., Wang, H., Uetake, Y., Yoshida, K., Yatomi, Y., Shirai, M., and Fujita T. 2013. Oxidative stress augments pulmonary hypertension in chronically hypoxic mice overexpressing the oxidized LDL receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 305:H155-162. doi 10.1152/ajpheart.00169.2012 査読あり

8. Isshiki, M., Nishimoto, M., Mizuno, R., and Fujita T. 2013. FRET-based sensor analysis reveals caveolae are spatially distinct Ca²⁺ stores in endothelial cells. *Cell Calcium* 54:395-403. doi 10.1016/j.ceca.2013.09.002 査読あり

9. Shibata S, Fujita T. Mineralocorticoid receptors in the pathophysiology of chronic kidney diseases and the metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 350:273-280, 2012. doi: 10.1016/j.mce.2011.07.018. 査読あり

10. Ando K, Fujita T. Pathophysiology of salt sensitivity hypertension. *Ann Med*.44 Suppl 1:S119-126, 2012. doi: 10.3109/07853890.2012.671538. 査読あり

11. Shimosawa T, Mu S, Shibata S, Fujita T. The kidney and hypertension:

pathogenesis of salt-sensitive hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 14(5):468-472, 2012. doi: 10.1007/s11906-012-0284-5. 査読あり

〔学会発表〕(計 17 件)

1. Fujita T., "Interactions between Sodium and Potassium on blood pressure and cardiovascular disease" at Asian Pacific Congress of Hypertension (APCH), (Invited Lecture) on February 12-15, 2014, Cebu city, Philippines

2. Invited lecture: Fujita T. "Epigenetics in salt-sensitive hypertension" at the 8th annual Winter Research Meeting on Translational Basic Science, European Society of cardiology, Les Diablerets-Switzerland, Jan 23- 26, 2013.

3. Fujita T., "The Mechanism for Activation of Mineralocorticoid Receptor in the Heart and Kidney" Gordon Research Conference "The Renin-Angiotensin System Beyond Angiotensin II", 2014 March (Keynote Lecture), Lucca (Barga), Italy

4. Fujita T., "Salt, obesity and hypertension" at The 5th Pulse of Asia, Apr 2013 (Plenary Lecture), Seoul, Korea

5. Fujita T., "The kidney and hypertension: The pathogenesis of Salt-Sensitive Hypertension", World Congress of Nephrology, Hong Kong, Jun 2013 (Plenary Lecture)

6. Fujita T., "Mineralocorticoid Receptor" at Cardiovascular Seminar "Fundamental Mechanisms of Hypertension", American Heart association (AHA), Nov 2013, Dallas, USA (Invited Lecture)

7. Fujita T., "The Mechanism of salt-sensitive hypertension" at Ruijin Hospital (Prof. Pingjin Gao, Shanghai Jiaotong University, School of Medicine) on May 23, 2013, Plenary lecture "salt, obesity and hypertension" at the 7th Oriental Congress of cardiology(OCC) May 24, 2013, Shanghai, China

8. Fujita T., "Honorary Membership Award" and Lecture "The pathogenesis of Salt-sensitive hypertension" at Working group of kidney at ESH meeting in Milan on June 15-17, 2013.

9. Fujita T., Chairperson at the High Blood Pressure Council, AHA on September 11-14, 2013 New Orleans, USA.

10. Fujita T., Chairperson at Basic and Clinical Science "Flipping the Switch: Small GTPases in CKD" at American Society of Nephrology (ASN) on November 7-9, 2013, Atlanta, USA

11. Invited lecture: Fujita T. "Activation

of Rac1-mineralocorticoid pathway in proteinuric kidney disease” at the 9th International Podocyte Conference, Miami, Florida USA. April 22-25, 2012

12. Invited lecture: Fujita T “The mechanism of salt-sensitive hypertension” at the 22nd European Society of Hypertension (ESH), London, United Kingdom. April 26 - 29, 2012.

13. Invited lecture: Fujita T “Role of Sympathetic nervous system in salt-sensitive hypertension”, at the satellite meeting of ISH 2012: “The neuropathophysiology of hypertension-an emerging therapeutic target”, Palm Cove, Queensland, September 25-28 2012.

14. Plenary lecture: Fujita T “The mechanism of salt-sensitive hypertension” at the 24th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension (ISH), Sydney, September 30-October 4, 2012.

15. Invited lecture: Fujita T “Rac1-MR activation in salt-sensitive hypertension”, at the satellite meeting of ISH 2012: “Aldosterone and salt: Heart and kidney”, Palm Cove Queensland, October 5 -7, 2012.

16. Symposium lecture: Fujita T “Activation of Rac1-MR pathway in salt-sensitive hypertension” at the 45th annual meeting of American Society of Nephrology San Diego, US, October 30-November 4, 2012.

17. Invited lecture: Fujita T “Role of Rac1-MR pathway in salt-sensitive hypertension” at European Section of Aldosterone Council, Hannover, Germany, November 23-24 2012

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田 敏郎 (FUJITA TOSHIRO)

東京大学名誉教授 / 東京大学先端科学技術
研究センター・特任研究員、名誉教授

研究者番号：10114125