

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790850

研究課題名(和文)慢性腎臓病の発症進展におけるエピジェネティック制御機構の関与と新治療戦略

研究課題名(英文)The Involvement of Histone Acetylation in the Progression of Nephrosclerosis

研究代表者

小畑 陽子(OBATA, Yoko)

長崎大学・病院(医学系)・准教授

研究者番号：30404289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：食塩感受性高血圧発症モデルのDahl salt-sensitive rat (DS rat)を用いて、腎硬化症の発症進展とヒストン修飾の関連を検討した。高塩分食投与により、糸球体硬化と間質線維化、ヒストンアセチル化亢進を認めた。ヒストンアセチル基転移酵素阻害薬であるクルクミン投与により、6週後の腎障害は抑制された。高塩分食投与投与群では、ヒストンアセチル化によりIL-6の遺伝子発現が増強しており、尿中IL-6の発現も増加していたことから、DS ratの腎硬化症発症進展には、ヒストンアセチル化に伴うIL-6の発現増加が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the involvement of epigenetics in the progression of nephrosclerosis. 6 week-old Dahl salt-sensitive rats were used as models of nephrosclerosis. Rats were divided into 3 groups: (i) normal salt diet (NS)group, (ii) high salt diet (HS) group, (iii) HS group administered daily curcumin, a histone acetyltransferase inhibitor (HS+C group). At 6 week, serum creatinine, interstitial fibrosis and glomerular sclerosis were increased markedly in HS group, whereas these were suppressed in HS+C group. The level of histone acetylation was enhanced in HS group compared to NS group, whereas the curcumin administration suppressed histone acetylation. In HS group, interleukin 6 (IL-6) gene and protein expression were increased by histone acetylation. Our results suggested that increased IL-6 gene expression induced by the enhancement of histone acetylation might be involved in the progression of nephrosclerosis, independently of hypertension.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：エピジェネティクス 腎硬化症 ヒストンアセチル化 IL-6 クルクミン

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性腎臓病患者の増加

近年、慢性腎臓病は末期腎不全や心血管病の大きな危険因子であることが明らかとなり、世界規模でその病態解明と治療法の開発が進められている。一方、我が国における慢性透析患者数は2010年末の調査で29万人を超え、毎年1万人前後増加し続けている現状にある。末期腎不全に至る三大原疾患のひとつである腎硬化症は、高血圧の長期持続により惹起され、輸入細動脈の硝子化、弓状動脈と葉間動脈にかけての内膜肥厚が出現し、これらの血管の変化により糸球体硬化や尿細管萎縮、間質の線維化が生じる。一般人口の高齢化に伴い今後も患者数の増加が予測されており、発症機序の解明と、進展抑制のための治療法の開発が望まれている。このような慢性腎臓病進展抑制への対策を講じることは透析導入患者数の増加に歯止めをかけると共に心血管疾患の発症を防止することにも繋がり、極めて重要と考えられる。

(2) 慢性腎臓病の発症進展とエピジェネティックな制御機構の関与

慢性腎臓病に共通の病態として、不可逆性で恒久的病態である糸球体硬化がみられるが、その分子機構は依然として明らかとなっていないのが現状である。エピジェネティクス機構は、遺伝子の塩基配列によらない遺伝情報の後天的な発現制御機構であり、DNAのメチル化やヒストンの化学修飾、クロマチンリモデリングにより担われる。近年、癌や生活習慣病といった後天的な多因子疾患に、このエピジェネティクス機構の異常が重要な役割を果たしている可能性が追究されている。腎間質線維化においては、線維芽細胞の活性化にDNAのメチル化などエピジェネティックな制御機構が関与していることが明らかとなり (Bachtel W et al. Nat Med 16: 544-550, 2010)、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤やDNAメチル化阻害剤が肺や心臓といった種々の臓器線維化モデルで抗線維化効果を示すという報告からもエピジェネティックな制御機構と線維化は密接に関連していると考えられる (Wang Z et al. Eur Respir J 34: 145-155, 2009)。また、わが国で多く見られる食塩感受性高血圧の発症メカニズムにもヒストンのアセチル化の関与が示唆されている (Mu Sheng et al. Nat Med 17: 573-581)。DNAのメチル化やヒストンの脱アセチル化による癌抑制遺伝子の不活化が発癌に関与していることも明らかとなっており、DNAメチル化阻害剤やHDAC阻害剤が癌に対する治療薬として、すでに臨床の場で使用されていることから、HDAC阻害剤やDNAメチル化阻害剤といったエピジェネティック作用薬は慢性腎臓病進展抑制への治療戦略のひとつとなる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

近年、慢性腎臓病が糖尿病・高血圧・高脂血症と並ぶ心血管疾患の危険因子であることが明らかとなってきたが、その発症進展の詳細な機序は依然として不明であり、有効な治療法も確立されていない。我々は慢性腎臓病の進展と遺伝子の塩基配列によらない遺伝情報の後天的な発現制御機構であるエピジェネティクス機構との関連を明らかにするため、ラット腎硬化症モデルの腎組織におけるヒストン H3 のアセチル化及びメチル化修飾動態、DNAのメチル化状態について細胞個々のレベルで分子組織細胞化学的方法論を用いて検討すると共に、同モデルへエピジェネティック作用薬投与を行い慢性腎臓病に対する新しい治療法としての可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 腎硬化症モデルならびに試料の作製

高塩分食摂取にて高血圧ならびに腎硬化症を発症する Dahl 食塩感受性ラットに8%塩分含有食投与を8週間行い、その後高塩分食投与開始から56日目まで屠殺し、腎組織は、新鮮凍結並びにパラホルムアルデヒド固定後パラフィンブロックとウエスタンプロット用試料として保存した。糸球体硬化の程度については、スコア化することで評価し、間質の線維化に関しては、マッソントリクローム染色にて線維化面積を評価した。Type IV コラーゲン、線維芽細胞のマーカーである fibroblast specific protein-13 (FSP-1) の発現も免疫組織化学で検討した。

(2) 腎硬化症モデル腎組織におけるヒストン H3 のアセチル化並びにメチル化解析

上記腎組織におけるエピジェネティック因子として、ヒストン H3Lys(9)、H3Lys(18)、H3Lys(23)のアセチル化及びヒストン H3Lys(27)のメチル化を特異抗体 (Cell Signaling) で免疫組織化学的に検出した。尚、これらの抗体の至適条件は既に検討済みである。結果は腎組織における陽性細胞数をカウントすると共に、画像解析装置 (Zeiss DAB システム) で染色強度を定量化する。

(3) クルクミン投与による糸球体硬化ならびに腎間質線維化抑制効果の検討

上記ラット腎硬化症モデルに高塩分食投与開始日より、ヒストンアセチル基転移酵素阻害薬であるクルクミン (100 mg/kg 体重) を連日胃管にて経口投与し、高塩分食投与開始より6週後に腎臓を摘出した。糸球体硬化の程度については、スコア化することで評価し、間質の線維化に関しては、マッソントリクローム染色にて線維化面積を評価し、コントロール群と比較検討した。更に、クルクミンが腎組織においてエピジェネティック因子に与える影響については上記と同様に免疫組織化学、ウエスタンプロット、ELISA で検出し、比較検討する。

(4) クルクミンが炎症及び酸化ストレス関連因子に与える影響

クルクミン投与による慢性腎障害進展抑制効果の機序を明らかにするため、炎症因子として、マクロファージのマーカとして ED-1、その遊走因子である MCP-1 の発現を免疫組織化学的に検出し、顕微鏡一視野あたりの腎組織における陽性細胞数をカウントし定量化した。酸化ストレス関連因子は、尿中 8OHdG を ELISA にて測定した。

(5) 腎硬化症の発症進展においてヒストンアセチル化により遺伝子発現が影響を受ける因子の検討

腎硬化症モデルの腎組織を用いて、クロマチン免疫沈降法を用いて、ヒストンアセチル化により遺伝子発現が影響を受ける遺伝子を検討した。

4. 研究成果

(1) 腎硬化症モデルならびに試料の作製

高塩分食摂取にて高血圧ならびに腎硬化症を発症する Dahl 食塩感受性ラットに 8%塩分含有食投与を 8 週間行った結果、高塩分食群では、糸球体硬化ならびに間質の線維化が惹起されていることを確認した。また、腎障害の進行とともに、高塩分食群では、Type IV コラーゲン陽性面積、線維芽細胞のマーカである fibroblast specific protein-1 (FSP-1)陽性細胞数は増加していた。

(2) 腎硬化症モデル腎組織におけるヒストン H3 のアセチル化並びにメチル化解析上記腎組織におけるエピジェネティック因子として、ヒストン H3Lys(9)、H3Lys(18)、H3Lys(23)のアセチル化 及びヒストン H3Lys(27) のメチル化を特異抗体で免疫組織化学的に検出した結果、高塩分食群の腎組織では、通常塩分食群に比べて有意に H3Lys(9)アセチル化細胞、H3Lys(27)トリメチル化細胞が増加していた。

(3) クルクミン投与による糸球体硬化ならびに腎間質線維化抑制効果の検討

6 週令 Dahl 食塩感受性ラットを 正常食群、高塩分食群、高塩分食+クルクミン投与群の 3 群に分けて 6 週後に腎臓を採取した。正常食群に比べて、高塩分食群と高塩分食+クルクミン投与群では投与開始 2 週後より収縮期血圧が上昇した。腎機能に関して、高塩分食群は 6 週後に血清クレアチニン値が有意に上昇したが、高塩分食+クルクミン群は上昇が抑制された。高塩分食群は、糸球体硬化と間質線維化を認め、ヒストンアセチル化も亢進したが、クルクミン投与群では、ヒストンアセチル化は抑制され、糸球体硬化や線維化も軽減していた。

(4) クルクミンが炎症及び酸化ストレス関連因子に与える影響

高塩分食投与群の腎組織では、浸潤マクロファージの増加ならびにその遊走因子である MCP-1 発現細胞の増加を認めた。一方、クルクミン投与にてマクロファージ数の減少、MCP-1 発現細胞数の減少を認めた。また、尿中 8OHdG は、高塩分食群にて高値を示し、ク

ルクミン群では、低値に保たれていた。

(5) 腎硬化症の発症進展においてヒストンアセチル化により遺伝子発現が影響を受ける因子の検討

クロマチン免疫沈降法を用いて、ヒストンアセチル化により遺伝子発現が影響を受ける遺伝子を検討したところ、ヒストンアセチル化により IL-6 の遺伝子発現が増強しており、クルクミン投与にてその発現は抑制傾向にあった。また、それに伴い、尿中 IL-6 の発現も高塩分食群にて増加していたことから、Dahl 食塩感受性ラットにおける人口化粧の発症進展には、ヒストンアセチル化に伴う IL-6 の発現増加が関与する可能性が示唆された。

以上より、Dahl 食塩感受性ラットの腎硬化症発症進展には、ヒストンアセチル化に伴う IL-6 の発現増加が関与する可能性が示唆され、ヒストンアセチル基転移酵素阻害薬であるクルクミンが腎硬化症の進展抑制効果を有することが示された。

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 15 件)

Kitamura M, Nishino T, Obata Y, Ozono Y, Koji T, Kohno S: New insights into therapeutic strategies for the treatment of peritoneal fibrosis: learning from histochemical analyses of animal models. *Acta Histochem Cytochem.* 47(4):133-143, 2014. 査読有
Io K, Nishino T, Obata Y, Kitamura M, Koji T, Kohno S: SAHA suppresses peritoneal fibrosis in mice. *Perit Dial Int.* 2014, in press. 査読有
Minami K, Nishino T, Arai H, Hirose M, Yamashita H, Uramatsu T, Obata Y, Funakoshi S, Harada T, Kohno S: Effect of switching from sevelamer hydrochloride to lanthanum carbonate on metabolic acidosis in dialysis patients. *Acta Med Nagasaki.* 58: 79-84, 2013. 査読有

Mori A, Nishino T, Obata Y, Nakazawa M, Hirose M, Yamashita H, Uramatsu T, Shinzato K, Kohno S: The effect of active vitamin D administration on muscle mass in hemodialysis patients. *Clin Drug Investig.* 33: 837-846, 2013. 査読有

Uramatsu T, Nishino T, Obata Y, Sato Y, Furusu A, Koji T, Miyazaki T, Kohno S: Involvement of apoptosis inhibitor of macrophages in a rat hypertension model with nephrosclerosis: possible mechanisms of action of olmesartan and azelnidipine. *Biol Pharm Bull.* 36:

1271-1277, 2013. 査読有
Nakazawa M, Obata Y, Nishino T, Abe S, Nakazawa Y, Abe K, Furusu A, Miyazaki M, Koji T, Kohno S: Involvement of leptin in the progression of experimentally induced peritoneal fibrosis in mice. *Acta Histochem Cytochem.* 46: 75-84, 2013. 査読有
Yamashita H, Nishino T, Obata Y, Nakazawa M, Inoue K, Furusu A, Takamura N, Maeda T, Ozono Y, Kohno S: Association between cystatin C and arteriosclerosis in the absence of chronic kidney disease. *J Atheroscler Thromb.* 20: 548-556, 2013. 査読有
Nakazawa Y, Nishino T, Obata Y, Nakazawa M, Furusu A, Abe K, Miyazaki M, Koji T, Kohno S: Recombinant human erythropoietin attenuates renal tubulointerstitial injury in murine adriamycin-induced nephropathy. *J Nephrol.* 26: 527-533, 2013. 査読有
Hirose M, Nishino T, Obata Y, Nakazawa M, Nakazawa Y, Furusu A, Abe K, Miyazaki M, Koji T, Kohno S: 22-Oxalcalcitriol prevents progression of peritoneal fibrosis in a mouse model. *Perit Dial Int.* 33: 132-142, 2013. 査読有
Obata Y, Nishino T, Kushibiki T, Tomoshige R, Xia Z, Miyazaki M, Abe K, Koji T, Tabata Y, Kohno S: HSP47 siRNA conjugated with cationized gelatin microspheres suppresses peritoneal fibrosis in mice. *Acta Biomater.* 8: 2688-2696, 2012. 査読有
Nishino T, Obata Y, Furusu A, Hirose M, Shinzato K, Hattori K, Nakamura K, Matsumoto T, Endo F, Kohno S: Identification of a novel mutation and prevalence study for fabry disease in Japanese dialysis patients. *Ren Fail.* 34: 566-570, 2012. 査読有
Nishino T, Ashida R, Obata Y, Furusu A, Abe K, Miyazaki M, Koji T, Kohno S: Involvement of lymphocyte infiltration in the progression of mouse peritoneal fibrosis model. *Ren Fail.* 34: 760-766, 2012. 査読有
Kawazu T, Nishino T, Obata Y, Furusu A, Miyazaki M, Abe K, Koji T, Kohno S: Production and degradation of extracellular matrix in reversible glomerular lesions in rat model of habu snake venom-induced glomerulonephritis. *Med Mol Morphol.* 45: 190-198, 2012. 査読有
Kitamura M, Nishino T, Obata Y, Furusu A, Hishikawa Y, Koji T, Kohno S: Epigallocatechin gallate suppresses

peritoneal fibrosis in mice. *Chem Biol Interact.* 195: 95-104, 2012. 査読有
Hayashi W, Obata Y, Nishino T, Abe S, Io K, Furusu A, Abe K, Miyazaki M, Sugaya T, Koji T, Kohno S: Glomerular repair retardation via blocking of angiotensin II type 1a receptor pathway in a mouse glomerulonephritis model. *Nephron Exp Nephrol.* 122: 13-22, 2012. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

Kumiko Muta, Yoko Obata, Takehiko Koji, Tomoya Nishino, Shigeru Kohno. The Involvement of Histone Acetylation in the Progression of Nephrosclerosis. ASN Kidney Week 2014, 2014年11月15日. Philadelphia, USA.

井生久美子、西野友哉、小畑陽子、北村峰昭、阿部伸一、南香名、小路武彦、河野茂: Dahl salt-sensitive rat の腎硬化症におけるヒストン修飾の関与. 第57回日本腎臓学会学術総会. 2014年7月5日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
井生久美子、西野友哉、小畑陽子、北村峰昭、阿部伸一、小路武彦、河野茂: 食塩感受性高血圧症モデルラットの腎障害発症進展におけるヒストン修飾の関与. 第56回日本腎臓学会学術総会. 2013年5月11日. 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

〔図書〕(計 0 件)

〔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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小畑 陽子 (OBATA, Yoko)

長崎大学・病院(医学系)・准教授

研究者番号：30404289