

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461244

研究課題名(和文) 食塩感受性高血圧の成因に関するエピジェネティクス解析

研究課題名(英文) Epigenetics of renin-angiotensin-aldosterone in salt-sensitive hypertension

研究代表者

武田 仁勇 (Takeda, Yoshiyu)

金沢大学・大学病院・特任教授

研究者番号：90242544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：塩分摂取が心血管系、副腎におけるアンジオテンシノーゲン(ANG)及びアルドステロン合成酵素遺伝子(CYP11B2)発現に及ぼすエピジェネティクス機構(従来考えられていた遺伝学の外側で働いている仕組みの研究)を解析し高血圧との関連を検討した。副腎球状層ではCYP11B2タンパク発現の高値と同遺伝子の低メチル化を呈した。食塩感受性高血圧ラットでは高食塩食により血管におけるCYP11B2遺伝子発現の増加、心筋におけるANGmRNA発現の増加および同遺伝子の低メチル化状態を呈した。食塩摂取量がRAAS遺伝子のメチル化に影響し、ホルモン産生や高血圧及び臓器障害に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Salt-sensitive hypertension is the most popular disease in Japan. CYP11B2 gene expression was elevated and methylation ratio was decreased in human adrenal glomerulosa. High salt diet increased vascular CYP11B2 mRNA expression and angiotensinogen mRNA levels in the heart in salt-sensitive hypertensive rats. Hypomethylation status of angiotensinogen gene was seen in the heart. High salt diet may influence methylation status of genes of renin-angiotensin-aldosterone system and cause hypertension.

研究分野：内分泌代謝

キーワード：アンジオテンシノーゲン エピゲノム 高血圧 食塩感受性 アルドステロン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 日本人は食塩摂取量が諸外国に比べて多く、高血圧患者のうち約5割は食塩感受性高血圧である。しかし高食塩食による血圧上昇の機序は明らかではない。申請者は高食塩食により心血管系や腎臓における組織からのアルドステロン産生の亢進や 11-hydroxysteroid dehydrogenase (11-HSD2)不活性化、レニン・アンジオテンシン系 (RAS)の活性亢進が食塩感受性高血圧の成因に重要な役割を果たしていることを報告してきた。心腎血管系には副腎とは独立したアルドステロン合成経路が存在し、食塩摂取量がその調節機構に関与することや、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬が組織に作用し降圧作用や心筋障害、腎機能障害の発症、進展を予防することを明らかにした。

(2) 申請者はアルドステロン合成酵素遺伝子である CYP11B2 遺伝子上流に2か所の DNA メチレーションサイトを見出し、CYP11B2 遺伝子発現に寄与していることを発見し、ヒトの副腎や心血管系、腎における CYP11B2 遺伝子発現とメチレーションの程度に負の相関があることを報告した。

## 2. 研究の目的

(1) アンジオテンシノーゲン遺伝子活性化機構を解明するためにヒトマクロファージ及び THP1 細胞を用いて、アンジオテンシノーゲン遺伝子遺伝子を活性化するプロモーターの同定、遺伝子の転写活性に重要な領域の絞込み、転写因子と結合領域の同定、培養細胞内における転写因子と結合領域との結合、内因性転写因子のノックダウンによる遺伝子発現レベルの変化を調べる。

(2) アンジオテンシノーゲン及び CYP11B2 遺伝子の急性刺激及び慢性刺激によるメチル化の影響を検討する。

(3) コントロールラット及び食塩感受性高血圧ラットを用いて食塩摂取の変化により心血管系及び腎におけるアンジオテンシノー

ゲン及び CYP11B2 遺伝子のメチル化への影響と遺伝子発現の関係を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 副腎皮質 H295R 細胞におけるアンジオテンシノーゲンの転写活性に重要な領域の絞込み

アンジオテンシノーゲンの転写活性部位は上流の USF1, ESR1, CEBPB, NR3C1, HNF4A が報告され(Circ Res 2008;103:940), 複数の CpG アイランドが存在している。H295R 細胞を用いて、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。5'-RACE で同定した各遺伝子のプロモーターを含む連続した 5'deletion construct を作製し、細胞にトランスフェクションし、プロモーター転写活性に重要な領域を絞り込んだ。

(2) 転写因子と結合領域の同定

絞り込んだプロモーター領域について、TESS (Transcription Element Search System) を用いて、転写因子結合領域 (cis-acting element) 及び転写因子を推定した。次に、EMSA (Gel shift assay) を行い、in vitro におけるタンパク-DNA 結合を証明した。その際、候補の転写因子に対する抗体を用いて supershift を観察し、その DNA 配列 (cis-acting element) と候補転写因子との結合を示した。次にルシフェラーゼの 5'deletion construct に転写因子結合領域の遺伝子異常を導入し、プロモーター活性の消失或いは減弱することを示した。

(3) 細胞内における転写因子と結合領域との結合 (タンパク-DNA interaction)

ChIP (Chromatin immunoprecipitation assay) を行い、H296R 細胞内におけるタンパク-DNA interaction を証明した。

(4) 内因性転写因子のノックダウンによるアンジオテンシノーゲン遺伝子の発現レベルの変化

転写因子に対する siRNA を行い、細胞内の内因性転写因子をノックダウンし、各因子の

発現に対する影響を mRNA 及びタンパク(活性)レベルで評価した。mRNA の発現量は real time PCR, タンパクの発現量はウェスタンブロットを用いて評価した。

(5) H295R 細胞を用いて培養液中に interleukin6 (IL6)を添加し 5 日間培養し、アンジオテンシノーゲン mRNA 発現, 転写活性部位のメチル化状態, メチル化活性, CREB1, NR4A1 結合状態, クロマチンアクセシビリティについて測定した。

(6) H295R 細胞を用いて培養液中にカリウムを添加し 28 日間培養し, CYP11B2mRNA 発現, 転写活性部位のメチル化状態, メチル化活性, CREB1, NR4A1 結合状態, クロマチンアクセシビリティについて測定した。

(7)ウイスターラット(n=5)に高、正、及び低食塩食にて 8 週間飼育し副腎における CYP11B2 mRNA, タンパク発現及びメチル化状態を検討した。腎臓における アンジオテンシノーゲン mRNA, タンパク発現及びメチル化状態も検討した

(8) 食塩感受性高血圧ラットを用いて高食塩食及び正食塩食を投与し心臓、腎臓、副腎におけるアンジオテンシノーゲン、CYP11B2 のメッセンジャーRNA(mRNA)及びタンパク発現の定量, DNA メチル化状態を測定し, 正食塩食投与ラットと比較検討した。mRNA の定量は real-time PCR, タンパク発現はウェスタンブロット法を用いた。各因子のプロモーター領域の DNA メチル化状態はパイサルファイトシークエンス法により評価した。

#### 4. 研究成果

(1) アンジオテンシノーゲン遺伝子の-459 ~ +66 の 17 ヶ所の CpG 部位のメチル化を検討し、CEBP 結合部位周囲の CpG 部位が遺伝子発現に関与していることを見出した。培養副腎細胞を用いて IL-6 による刺激のメチル化と遺伝子及びタンパク発現への影響を検討した所、添加後遺伝子発現は 36 時間、タンパク発現は 24 時間まで増加した。低メチ

ル化状態は 36 時間まで持続した。IL-6 により CEBP 結合部位に CEBPB がリクルートされ IL-6 処理中は持続していたが、刺激中断後 5 日目で刺激前の状態に帰した。IL-6 は CEBP 結合部位及び転写開始サイトにおけるクロマチンアクセシビリティを増加させた。IL-6 はメチル化活性を低下させ、脱メチル化活性には影響を及ぼさなかった。

(2) 副腎培養細胞を用いた CYP11B2 遺伝子のメチル化、遺伝子発現に及ぼすカリウム(K)の影響を検討した所、K 刺激により CYP11B2 発現は 4 日目から有意に増加し、7 日目まで高値が持続した。4 日目からメチル化は低下した。CREB1, NR4A1 も 4 日目から増加し、メチル化活性は 7 日目から増加した。クロマチンアクセシビリティは 4 日目から増加し 7 日目まで持続した。アンジオテンシノーゲンの IL-6 刺激や CYP11B2 の K 刺激のデータから転写活性調整部位のメチル化により遺伝子発現が調節され、可逆的であることが示唆された。

(3) 生活習慣がレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系遺伝子のメチル化に影響するか検討した所、8 週間の高食塩食では血、尿中アルドステロン値の低下、副腎における CYP11B2 mRNA 発現及びタンパク発現が低値を示し、CYP11B2 上流の 3 か所の CpG 部位も高メチル化状態を示した。低食塩食では逆の現象が観察された。このように摂取塩分量がメチル化に影響し、遺伝子、タンパク発現に関与している可能性が示唆された。

(4) 高血圧との関連を検討する目的で、食塩感受性高血圧ラットを用いて、食塩バランスと心臓、腎臓における CYP11B2 遺伝子、アンジオテンシノーゲン遺伝子のメチル化と遺伝子発現を検討した所、高食塩食により血圧の上昇、心肥大、腎障害(尿中アルブミン排泄量を指標)が見られたが、各臓器におけるアンジオテンシノーゲン遺伝子発現とメチル化は負の相関を認めた。高食塩食による高血

圧発症の誘因にレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系遺伝子のメチル化が一部関与している可能性が示唆された。

<引用文献>

1. Takeda Y, Yoneda T, Demura M, Miyamori I, Mabuchi H. Cardiac aldosterone production in genetically hypertensive rats. Hypertension 2000;36:495-500
2. Zhu A, Yoneda T, Demura M, Karashima S, Usukura M, Yamagishi M, Takeda Y. Effect of mineralocorticoid receptor blockade on the renal renin-angiotensin system in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. J Hypertension 2009; 27: 800-805
- 3 Takeda Y. Effects of eplerenone, a selective mineralocorticoid receptor antagonist, on clinical and experimental salt-sensitive hypertension. Hypertension Res. 2009; 32: 321-324

#### 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)

Karashima S, Yoneda T, Kometani M, (他 8 名,11 番目). Comparison of eplerenone and spironolactone for the treatment with primary aldosteronism. Hypertens Res 39;133-137,2016 ((査読有)

Demura M, Demura Y, Takeda Y, Saijioh K. Dynamic regulation of the angiotensinogen gene by DNA methylation, which is influenced by various stimuli experienced in daily life. Hypertens Res 2015; 38:519-527 (査読有)

Wang F, Demura M, Cheng Y, (他 13 名 16 番目). Dynamic CCAAT/enhancer binding protein (CEBP)-associated changes of DNA methylation in the angiotensinogen gene. Hypertension 2014; 63:281-288(査読有)

武田仁勇, 出村昌史, (他2名,1番目). 原発性アルドステロン症は治療抵抗性高血圧か? 循環器専門医 2013; 21:277-281(査読無)

武田仁勇 ミネラルコルチコイド受容体

拮抗薬の長所と短所 循環器内科  
2013;74:370-375(査読無)

[学会発表](計 13 件)

Takeda Y, Takeda Y, Yoneda T, Kometani K, Karashima S, Hashimoto A Epigenetic control of CYP11B2 gene by high salt diet. ENDO2016 April 1-4, 2016 Boston (USA)

武田仁裕, 出村昌史, 米田隆, 米谷充弘, 唐島成宙, 若林祐介, 奥田理香, 山岸正和, 武田仁勇 急性刺激及び慢性刺激によるアルドステロン合成酵素遺伝子CYP11B2のメチル化への影響 第89回日本内分泌学会学術総会 Apr.21-23, 2016 京都国際会館(京都府・京都市)

武田仁勇, 出村昌史, 米田隆, 米谷充弘 ステロイド合成酵素遺伝子のエピジェネティクス 第89回日本内分泌学会学術総会 Apr.21-23,2016 京都国際会館(京都府・京都市)

武田仁勇, 出村昌史, 米田隆, 武田仁裕, 米谷充弘 食塩感受性高血圧におけるレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系のエピジェネティクス 第38回日本高血圧学会総会 Oct.9-11,2015 ひめぎんホール(愛媛県・松山市)

武田仁裕, 米田隆, 米谷充弘, 臼倉幹哉, 若林祐介, 奥田理香, 出村昌史, 山岸正和, 笹野公伸, 織田展成, 武田仁勇 肥太心におけるアンジオテンシノーゲン遺伝子のエピジェネティック制御 第38回日本高血圧学会総会 Oct.9-11,2015ひめぎんホール(愛媛県・松山市)

武田仁勇, 米谷充弘, 唐島成宙, 米田隆, 武田仁裕, 青野大輔, 出村昌史, 橋本篤, 山岸正和 高食塩食によるアルドステロン合成酵素遺伝子CYP11B2のメチル化への影響 第88回日本内分泌学会学術総会 Apr.23-25,2015 京王プラザ(東京都・東京)

出村昌史, 王芬, 唐島成宙, 米田隆, 武田仁勇, 西條清史 アルドステロンはコルチゾール以上にヒト内臓脂肪アンジオテンシノーゲン転写を刺激する 第88回日本

内分泌学会学術総会 Apr.23-25, 2015京王  
プラザ(東京都・東京)

Takeda Y, Yoneda T, Kometani M, Karas  
hima S, Takeda Y, Aono D. High salt die  
t influences angiotensinogen gene epige  
nesist in salt-sensitive hyperten  
sive rats. ESH2015 June 12-15 2015 Mil  
ano (Italia)

Takeda Y, Takeda Y, Yoneda T, K  
ometani M, Karashima S, Hashimoto A E  
pigenetic effect of high salt diet on an  
giotensinogen gene in salt-sensitive hypert  
ensive rats. ENDO2015 March 5-8,  
2015 San Diego (USA)

Kometani M, Yoneda T, Takeda Y, Karas  
hima S, Takeda Y Epigenetic controls of  
CYP11B2 and CYP11B1 gene in subclinic  
al Cushing syndrome associated with over  
production of aldosterone. The 16th Intern  
ational Congress of Endocrinology  
June 21-24, 2014 (Cicago, USA)

Takeda Y, Yoneda T, Kometani M, Wa  
ng F, Takeda Y, Karashima S Epige  
netic control of renin-angiotensin- aldoster  
one system in hypertrophic heart. The 17t  
h European Congress of Endocrinol  
ogy May 3-7, 2014 (Wroctaw, Pola  
nd)

出村昌史, 武田仁勇 DNAメチル化の動的  
変化によるCYP11B2の発現調節 第87回  
日本内分泌学会学術総会Apr.24-26, 2014  
福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

王芬, 出村昌史, 程媛, 米田隆, 米谷充  
弘, 大江真史, 武田仁裕, 橋本篤, 武田  
仁勇 インターロイキン6のCCAAT/enhanc  
er binding protein(C/EBP)領域を介するア  
ンジオテンシノーゲン遺伝子のメチレー  
ション制御 第87回日本内分泌学会学術  
総会 Apr.24-26, 2014 福岡国際会議場  
(福岡県・福岡市)

〔図書〕(計1件)

Takeda Y, Yoneda T, Karashima  
S. Medical treatment of primary

aldosteronism Per Hellman Ed. Pp209-214  
Springer, New York, 2014 (査読有)

〔その他〕  
ホームページ等

[http: intmed2.w3.kanazawa-u.ac.jp](http://intmed2.w3.kanazawa-u.ac.jp)

6 . 研究組織  
(1)研究代表者

武田 仁勇 (TAKEDA, Yoshiyu)  
金沢大学・附属病院・特任教授  
研究者番号 : 46857125

(2) 研究協力者

武田 仁裕 (TAKEDA, Yoshimichi)  
王 芬 (WANG, Fen)