

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860669

研究課題名(和文) 鉱質コルチコイド受容体活性化に伴うエピジェネティクス異常の解明

研究課題名(英文) Exploring the Epigenetic Abnormalities of Mineralocorticoid Receptor Activation in Salt-sensitive Hypertension and Nephropathy

研究代表者

河原崎 和歌子 (Kawarazaki, Wakako)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任研究員

研究者番号：50424594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肥満や塩分過剰摂取などの環境因子と関連した食塩感受性高血圧や腎障害の発症原因の探求を目標とし、食塩感受性高血圧モデル動物の腎尿細管におけるNa排泄機構異常の解析を行った。腎臓におけるNa再吸収の調整因子としては交感神経系、RAA系、インスリンなどが知られるが、そのエフェクターとして、肥満高血圧ラットにおいてはヘンレ系蹄太い上行脚のNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>-共輸送体(NKCC2)の亢進が関与している事が示唆された。申請者は過剰食塩摂取がどのように、このNKCC2の異常を招き、肥満における高血圧発症に関わるかを解析し、関連遺伝子のエピジェネティクス異常の関与につき検討している。

研究成果の概要(英文)：To explore the pathogenesis of salt-sensitive hypertension and kidney injury, which is deeply associated with obesity and intake of excess salt, we investigated the abnormalities of sodium transporter of kidney tubules in salt-sensitive hypertensive rodents. Sympathetic nerves system, renin-angiotensin-aldosterone system and insulin are considered to affect the regulation of sodium absorption in the kidney of obese hypertensive rats, and we found that the involvement of the activation of Na-K-2Cl-cotransporter (NKCC2) might be involved to it as effector. We are investigating how intake of excess salt induces the aberrant activation of NKCC2, and obesity develops hypertension. Furthermore, we plan to clarify that epigenetic abnormalities of NKCC2-associated genes might be involved to it.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：高血圧症 腎臓 食塩感受性 ナトリウム輸送体 エピジェネティクス

1) 研究開始当初の背景

**(1)食塩感受性高血圧症及び腎障害における MR 活性化の重要性**

近年、塩分の取り過ぎや過食といった生活習慣の変化に伴い、アルドステロン-鉱質コルチコイド受容体(MR)系の過剰な活性化が生じ、高血圧や心血管病、慢性腎臓病など予後を規定する疾患に深く関与することが注目されている。特に近年増加している、メタボリックシンドロームや肥満者においても、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン(RAA)系は亢進しており、食塩感受性高血圧や腎障害を合併しやすいことが報告されていた。一方、アルドステロンは食塩過剰摂取でないと腎障害を生じないという、食塩負荷は血漿アルドステロン濃度を低下させるにもかかわらず、腎でMRを活性化して腎障害発症を引き起こすことが知られており、食塩によるMR活性化機構は長年の謎であった。その機序につき、申請者の研究グループではMR活性化因子として、低分子量G蛋白Rac1を同定し、Rac1がアルドステロン非依存性にMRを活性化し腎障害を引き起こすこと、Rac阻害薬が腎保護薬として有望であることを世界に先駆けて報告してきた(Shibata S. et al., Nat Med, 2008)。また、食塩刺激によるRac1の活性化が食塩感受性高血圧や食塩依存性腎障害の発症を決定づける事を続けて報告してきた(Shibata S. et al., J Clin Invest. 2011)。さらに、今までAngIIが主体と思われていたAngII/食塩依存性腎障害の病態においても、食塩刺激により引き起こされる、Rac1の活性化がアルドステロンと相乗的にMRを活性化し、腎障害発症に中心的な役割を生じること、さらにその制御にRac1阻害薬がMR拮抗薬と同等に有効であることを新た報告し(Kawarazaki W. et al, J Am Soc Nephrol., 2012)、臨床的にRAA系が亢進した病態は

Rac1が治療標的になり得る可能性を指摘していた。

**(2)食塩感受性高血圧症及び腎症におけるエピジェネティクス異常の可能性**

エピジェネティクスは塩基配列そのものは変えずに、DNAメチル化やヒストン修飾の変化によって遺伝子発現を制御する機構であり、がんや慢性疾患において、加齢や感染、化学物質への暴露などの環境要因が誘因となり、エピジェネティクス異常が生じることが知られている(Issa, J.P. et al., Nat Genet., 2012)。腎臓病におけるエピジェネティクス機構の意義については、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬が腎炎モデルマウスの予後を改善し(Imai N., et al, Stem Cells, 2007)、これがヒストン修飾変化に基づく線維化の抑制作用や炎症性細胞の浸潤抑制作用による(Marumo T., Am J Physiol Renal Physiol, 2010)ことや、HDAC5の減少が内因性再生反応に関わる事(Marumo T, J Am Soc Nephrol, 2008)が報告されていた。また、食塩感受性高血圧症の発症に、腎臓のHDAC抑制によるヒストン修飾異常が関与することが報告されており(Mu S, et al., Nat Med, 2011)、食塩摂取や肥満などの環境因子が、塩分排出やホルモン生成に関わる遺伝子の形質をエピジェネティック修飾することで機能発現を制御し、高血圧症や腎臓病の発症起因となっている可能性が考えられた。そこで、本研究では食塩感受性高血圧症及び腎症の発症において、食塩刺激によりMR活性化機構にエピジェネティクス異常が生じていないか、新たな治療の標的となりうるかを検討することとした。

2) 研究の目的

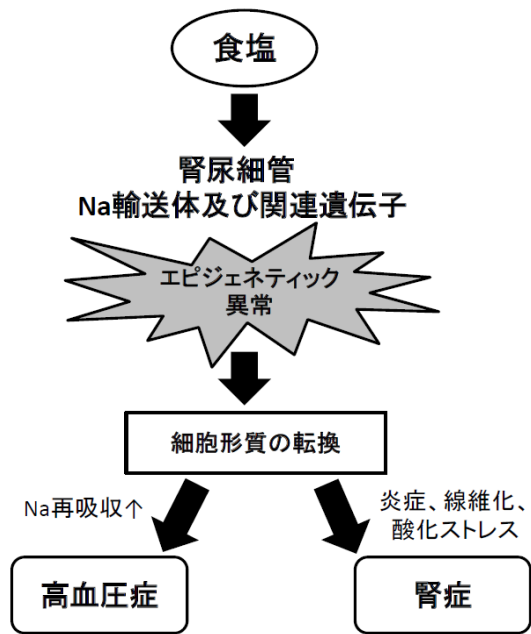
**食塩感受性高血圧症及び腎症における Na 輸送体異常とエピジェネティクスの関与を示し、エピジェネティック異常を標的と**

**した、より信頼度の高い診断法と副作用の少ない治療法の開発を目指す。**

食塩感受性高血圧症の発症には、それぞれ近位尿細管の  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体(NHE-3)及び  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  共輸送体(NBCe1)系、ヘンレ係蹄太い上行脚の  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  共輸送体(NKCC2)、遠位尿細管の WNK4-  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  共輸送体(NCC)系、遠位尿細管～集合管の Rac1-MR- 上皮性ナトリウムチャンネル(ENaC)系等の異常活性化が関与すると考えられている。これら尿細管を部位毎に単離することで、特に食塩刺激がどの部位の Na 再吸収機構にエピジェネティクス異常を招き、機能発現に影響しているかを明らかにすることが可能である。食塩感受性高血圧症の発症メカニズムにおいて、遠位尿細管の WNK4-NCC 系については、既に腎臓の HDAC 抑制によるヒストン修飾異常が関与することが報告されていた(Mu S, et al., Nat Med, 2011)。このことをふまえて申請者は、エピジェネティクス異常の関与がまだ未解明である、Rac1-MR-ENaC 系を初めとした Na 輸送体の食塩過剰や肥満環境下での異常活性化に注目し、関連遺伝子が食塩負荷によりどのようなエピジェネティクス異常を生じ、食塩感受性高血圧や腎症の発現に関わっているかを明らかにし、さらに DNA メチル化修飾薬やヒストン修飾薬などのエピジェネティクス作用薬による治療が可能であるかを検証し、高血圧症及び慢性腎臓病の新たな治療標的とすることを目標とした(左上図)。

高血圧症および慢性腎不全は根本的な治療法が確立されていない。これら病態の原因になっている刺激やそれにより生じる DNA メチル化異常やヒストン修飾異常の解明が、新たな診断法や治療法の開発につながると考えられる。また、ヒストン修飾酵素阻害薬、DNA メチル化修飾薬などのエピジェネティクス作用薬によるエピジェネ

ティクス異常を是正することで根本的な治療が可能になる可能性がある。



3) 研究の方法

食塩感受性や肥満といった因子の腎尿細管ナトリウム輸送体発現への影響を調べるために、食塩抵抗性ラット、食塩感受性高血圧ラット及び、食塩感受性高血圧肥満ラットを用いた。それぞれ2群に分け、低食塩食単独飼育下(低食塩群)とさらに食塩水を与えた(食塩負荷群)環境で2週間飼育を行い、経時的に血圧測定、24時間蓄尿により評価を行った。負荷終了後にイソフルラン麻酔下で採血を施行し、安楽死させたのち、腎臓及び心臓を採取し凍結保存した。解析は全腎を用いて腎尿細管における各ナトリウム輸送体の遺伝子及び蛋白発現を quantitative real-time PCR や Western blotting 法を用いて行った。また、尿細管をセルソーターを用いて単離し、ナトリウム輸送体及び関連遺伝子の DNA メチル化異常を COBRA 法、パイサルファイトシーケンシング法、網羅的解析を用いて評価することとした。

4) 研究成果

負荷2週の時点での血圧は、低食塩群間で

は食塩抵抗性ラットに比べ、食塩感受性ラット及び食塩感受性肥満ラットで上昇していた。食塩抵抗性ラットでは食塩負荷による有意な血圧上昇を認めなかったが、食塩感受性高血圧ラットではわずかに上昇し、食塩感受性高血圧肥満ラットではさらに血圧が上昇していた。食塩抵抗性ラット、食塩感受性高血圧ラット及び、食塩感受性高血圧肥満ラットの食塩摂取量を比較すると、低食塩食群においては差がなかったが、食塩負荷群では、食塩抵抗性ラットに比べ、食塩感受性ラット及び食塩感受性肥満ラットの食塩摂取量が増加していた。体重あたりの尿中ナトリウム排泄量は低食塩群間では変化なく、食塩負荷群間では食塩感受性高血圧ラットにおいて他の2種のラットより有意な増加を認めた。1日の尿中蛋白排泄量に注目すると、低食塩群で、食塩感受性肥満ラットは他の2種のラットより既に優位な増加を認めており、食塩負荷によりさらに有意な増加を示し、他の2群が食塩負荷による変化を示さなかったのと対照的であった。すなわち食塩感受性ラット群の方が食塩摂取が多いが、さらに肥満があると尿中へのナトリウム排泄量が低下していることが示唆された。この時の腎尿細管ナトリウム輸送体の蛋白発現に注目すると、食塩抵抗性ラットに比べ、食塩感受性高血圧ラットでは有意なNCCの上昇が認められた。また、食塩感受性高血圧ラットと食塩感受性高血圧肥満ラットでは後者で優位に食塩摂取時のNKCC2の発現が亢進していた。以上より食塩感受性高血圧発症にNCCが関わり、さらに肥満時はNKCC2が亢進してさらなる血圧上昇を増強することが示唆された。現在は各ナトリウム輸送体およびその関連遺伝子発現のエピジェネティック修飾につき解析中である。DNAメチル化変化はヒストン修飾変化を伴う事が多く、ヒストン修飾はH3K9アセチル化

のように変化しやすいものや、H3K27メチル化のように遺伝子発現抑制が固定化しやすいものなど、様々なものが存在するため、標的Na輸送体のDNAメチル化異常が経時的にどのようなヒストン修飾異常を伴っているか、ChIP解析を用いて検討し、遺伝子発現変化がどのように固定化し、食塩感受性高血圧症及び腎症の不可逆的障害に至るかを検討中である。

#### 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8件)

1. Kawarazaki W, Fujita T. Aberrant Rac1-mineralocorticoid receptor pathways in salt-sensitive hypertension. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, 2013;40(12):929-36, doi: 10.1111/1440-1681.12177. 査読有.
2. Yoshida S, Ishizawa K, Ayuzawa N, Ueda K, Takeuchi M, Kawarazaki W, Fujita T, Nagase M. Renin inhibition ameliorates renal damage through prominent suppression of both angiotensin I and II in human renin angiotensinogen transgenic mice with high salt loading. **Clin Exp Nephrol.**, 2014;18(4):593-9, doi: 10.1007/s10157-013-0893-6. 査読有.
3. Yoshida S, Ishizawa K, Ayuzawa N, Ueda K, Takeuchi M, Kawarazaki W, Fujita T, Nagase M. Local Mineralocorticoid Receptor Activation and the Role of Rac1 in Obesity-Related Diabetic Kidney Disease. **Nephron Exp Nephrol.**, 2014;126(1):16-24, doi: 10.1159/000358758. 査読有.
4. Marumo T, Yagi S, Kawarazaki W, Nishimoto M, Ayuzawa N, Watanabe A, Ueda K, Hirahashi J, Hishikawa K, Sakurai H, Shiota K, Fujita T. Diabetes

Induces Aberrant DNA Methylation in the Proximal Tubules of the Kidney. **J Am Soc Nephrol.** published ahead of print February 4, 2015,

doi:10.1681/ASN.2014070665. 査読有.

5. 河原崎和歌子、藤田敏郎、『生活習慣病とエピジェネティクス』、**Nephrology Frontier**、2013.9.Vol.12 No.3, pp76-77、査読なし

6 河原崎和歌子、藤田敏郎、『生活習慣病とエピジェネティクス』、**Nephrology Frontier**、2013.12.Vol.12 No.4, pp76-77、査読なし

7. 河原崎和歌子、長瀬美樹、『Rac1 と RAAS』、**Angiotensin Research**、2013, vol 10, pp226-233、査読なし

8. 河原崎和歌子、藤田敏郎、『食塩と高血圧研究の最前線』、**実験医学**、2015, vol 33, No.7, pp72-78、査読なし

〔産業財産権〕

出願・取得 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

河原崎和歌子 (Wakako Kawarazaki)

東京大学・先端科学技術研究センター

特任研究員

研究者番号：50424594