

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670426

研究課題名(和文)食塩感受性高血圧の発症と持続に関わるエピゲノム異常の解明

研究課題名(英文)Exploration of epigenome abnormalities involved in salt sensitive hypertension

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：食塩感受性高血圧にはエピゲノム異常に関わる可能性がある。食塩吸収にかかわる分子の変化を尿細管ごとに解析した。高血圧を呈する糖尿病マウスでは近位尿細管で、アンジオテンシノーゲン遺伝子にDNAメチル化異常が生じていることがわかった(J Am Soc Nephrol 2015)。異常メチル化によって発現が増加したアンジオテンシノーゲンが血圧上昇に関わる可能性がある。

さらに、アンジオテンシンIIによる高血圧モデルでは食塩再吸収に関わるペンドリンの増加がみられた。間在細胞特異的にEGFPを発現するマウスを作出し、ソーティングで間在細胞を分取しエピゲノム変化の検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：Aberrant epigenome may underlie the pathogenesis of salt sensitive hypertension. We analyzed changes in molecules involved in salt reabsorption in a cell-type specific manner. We found that the promoter region of angiotensinogen is aberrantly demethylated in the proximal tubules of diabetic mice, which develop hypertension (J Am Soc Nephrol 2015). Aberrant demethylation of angiotensinogen may lead to persistent activation of salt absorption and/or renal injury. In addition, we observed that pendrin, a molecule involved in reabsorption of salt, is upregulated in hypertension induced by infusion of angiotensin II. We collected intercalated cells from Atp6v1b1-EGFP mice by sorting and now investigating the changes in epigenome.

研究分野：腎臓内分泌内科

キーワード：エピゲノム 食塩感受性高血圧 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

若年期の食塩摂取が多いとその後の血圧が高くなることは古くから知られており (BMJ 1988, 297,319) 高血圧発症前にアンジオテンシン II 受容体拮抗薬を投与するとその後の高血圧発症を抑制できることが報告されている (N Engl J Med 2006 TROPHY 試験)。これらのことは発症以前の環境因子が何らかの仕組みで体に記憶されてその後高血圧が発症に関わることを示している。わたしたちは最近、若年 SD ラット片腎摘出モデルや Dahl-S ラットを用いて、若年期の食塩負荷がその後の高血圧と腎障害を強く悪化させ、鉍質コルチコイド受容体(MR)活性化と酸化ストレスの過剰が若年期の記憶形成に関わることを明らかにした (NDT 2010, Am J Physiol 2011, J Hypertens 2012)。

エピジェネティクスは塩基配列そのものを変えずに、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る。がんや慢性疾患では、加齢、感染、化学物質などの環境要因がエピジェネティクス異常を引き起こすことが知られている (Nat Genet 2012,43,724)。わたしたちは、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、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 (Stem Cells 2007)、これがヒストン修飾変化に基づく抗線維化および抗炎症作用による (Am J Physiol 2010) ことや、HDAC5 の減少が内因性再生反応に関わる事 (J Am Soc Nephrol 2008) を見出した。さらに、食塩感受性高血圧症の発症に、腎臓の HDAC8 活性の抑制によるヒストン修飾異常が関与することを報告した (Nat Med 2011)。

これらの所見に基づき本研究では、食塩感受性高血圧発症に記憶維持に関わるエピゲノム異常の関与について検討を加えた。

2. 研究の目的

食塩感受性高血圧症では尿細管による食塩再吸収の異常が生じている。尿細管各部位について、近位尿細管では Na⁺/H⁺ 交換輸送体 (NHE-3) 及び Na⁺-HCO₃⁻ 共輸送体 (NBCe1) 系、遠位尿細管では WNK4- Na⁺-Cl⁻ 共輸送体 (NCC) 系、遠位尿細管～集合管では Rac1-MR 系及び上皮性ナトリウムチャンネル (ENaC) が Na 再吸収に重要な働きをしている。これらの分子のエピジェネティック異常を調べるために、尿細管を部位毎に単離して、組織特異的に DNA メチル化・ヒストン修飾および食塩感受性高血圧に関わる遺伝子発現について検討を加える。さらに、鉍質コルチコイドの役割を明らかにするために、副腎摘出した動物を用いた検討・MR 拮抗薬を用いた検討を行う。以上の検討から食塩感受性高血圧でみられるエピジェネティック異常とその成立過程を明らかにする。エピジェネティック異常に基づいた高血圧発症メカニズムの解明は、高血圧の維持の原因に迫ることとなり、高血圧予防

および治癒を目指した治療法開発につながるものと期待される。

3. 研究の方法

1) 尿細管各分画の分取

遠位尿細管および集合管の採取法を確立させ、近位尿細管細胞に加え各分画の mRNA、DNA メチル化の解析を行った。

2) 食塩感受性モデルの尿細管ごとの解析

食塩感受性も出る動物から 1) で確立した方法を用いて腎臓尿細管分画を分取し、とくに血圧調節に関わると思われる Na 輸送関連遺伝子の発現変化を検討した。引き続き DNA メチル化変化を COBRA 法で解析し、また腎臓のヒストンアセチル化、メチル化の変化を ChIP 法を用いて調べた。

変化が認められたものについては、経時的・細胞種特異的な解析を進め、エピジェネティック異常がヒストン修飾異常から DNA メチル化異常へと重層化し、遺伝子発現変化の固定化にどのように関わっているか検討した。本研究によって明らかにするエピジェネティック異常の重層化過程が、食塩感受性高血圧症及び腎症の不可逆的障害を説明する基盤になると期待される。

3) 鉍質コルチコイドの役割の解明

食塩感受性高血圧の発症と各分子の変化に鉍質コルチコイド、アルドステロンが関わる可能性について、副腎摘出したマウスを用いて検討を加えた。

4. 研究成果

1) 尿細管各分画の分取

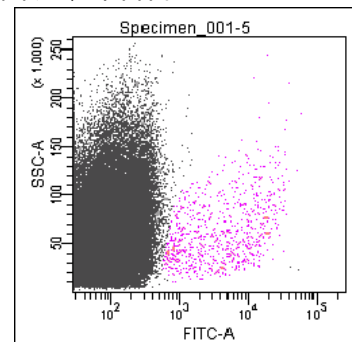
近位尿細管

マウスから Lotus lectin で染色してソーターにより近位尿細管を分取する方法を確立することができた (Marumo et al J Am Soc Nephrol 2015)。本法を用いて分取した近位尿細管細胞とそのほかの腎臓細胞を比較して DNA メチル化を網羅的に解析し、近位尿細管特異的に脱メチル化している遺伝子を複数同定した。その中には Sglt2 や HNF4a など近位尿細管で重要な機能を果たす遺伝子が複数含まれており、これらの遺伝子は DNA メチル化レベルで発現が調節されていると思われた。

集合管・間在細胞

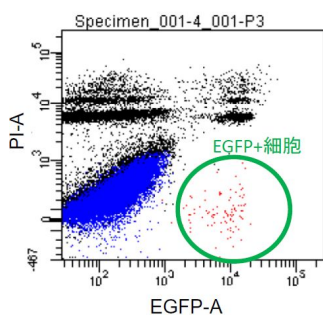
同様の手法を用いて Dolicos lectin で染色し集合管を採取し、集合管のマーカーである AQP2 が濃縮していることを確認した (右図)。

血圧の調節には腎接合尿細管・集合管の間在細胞が重要な働きを示すことが

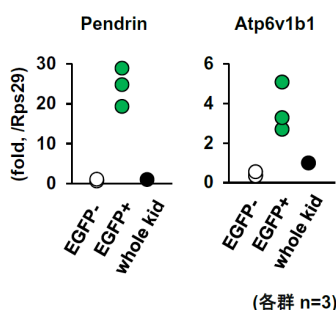


最近明らかになった。そこで間在細胞に Cre recombinase を発現する Atp6v1b1-Cre マウスと、R26R-H2B-EGFP マウス (Riken) を交配し、間在細胞に EGFP を発現するマウスを作成した。EGFP によりソートしたところ 2~3 × 10⁵ 個/匹の EGFP 陽性細胞が安定して採取され (右図)、さらに Pendrin 等の免疫染色および qRT-PCR により間在細胞分画であることが確認できた (下図)。

腎全細胞浮遊液を調製し
FACSIにてEGFP+細胞を分取



EGFP+細胞からRNAを抽出し
quantitative RT-PCR



2) モデル動物での検討

近位尿細管

高血圧を呈することが知られている db/db マウスの近位尿細管での高血圧関連分子の検討を行った。その結果、アンジオテンシノーゲンの発現が上昇し、DNA メチル化の脱メチル化が生じていることがわかった。経時的検討により、アンジオテンシノーゲンのプロモーターではヒストンアセチル化の増加に引き続いて DNA が脱メチル化しエピゲノム異常の重層化が代謝異常に伴って生じていることがわかった。エピゲノムレベルでの異常を伴うアンジオテンシノーゲンの過剰発現が高血圧・腎障害に関わる可能性が示唆された (Marumo et al J Am Soc Nephrol 2015)。

集合管・間在細胞

集合管間在細胞に発現する Cl⁻/HCO₃⁻ 輸送体 Pendrin は、体液 NaCl バランスと血圧維持に寄与し、活性調節にはレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 (RAA 系) が関与することが知られているが、発現調節は明らかでなかった。間在細胞のソートが成功したため、Pendrin の発現をアンジオテンシン II (AngII) 投与を行ったマウスで検討した。AngII 投与により血中アルドステロンの上昇と共に、膜 Pendrin 蛋白および mRNA の増加を認めた。アルドステロンの Pendrin 増加に

対する役割を明らかにするために、副腎摘を行ったマウスで同様の検討を行ったところ、Pendrin の増加は抑制された。一方、アルドステロンの補充により回復したことからアルドステロンの重要性が示唆された。しかしアルドステロン単独投与では血中 AngII 低下と低カリウム血症を生じ、Pendrin の上昇は認められなかった。以上の結果から、Pendrin の増加には Ang II、アルドステロン双方とも必要であることが示唆された。現在、ChIP によりヒストン修飾の変化を伴うか否か、さらに Atp6v1b1-EGFP マウスから間在細胞を単離し DNA メチル化レベルでの変化がどうか検討を進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. The Role of Aldosterone in Obesity-Related Hypertension. Wakako Kawarazaki and Toshiro Fujita. *Am J Hypertens*. 2016; 29(4): 415-23. doi: 10.1093/ajh/hpw003、査読あり
2. Rac1 - Mediated Activation of Mineralocorticoid Receptor in Pressure Overload-Induced Cardiac Injury. Nobuhiro Ayuzawa, Miki Nagase, Kohei Ueda, Mitsuhiro Nishimoto, Wakako Kawarazaki, Takeshi Marumo, Atsu Aiba, Takayuki Sakurai, Takayuki Shindo, Toshiro Fujita. *Hypertension*. 67, 99-106, 2016. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06054、査読あり
3. The Role of CNS in the Effects of Salt on Blood Pressure. Megumi Fujita and Toshiro Fujita. *Curr Hypertens Rep*. 2016; 18(2): 10. doi: 10.1007/s11906-015-0620-7、査読あり
4. Diabetes Induces Aberrant DNA Methylation in the Proximal Tubules of the Kidney. Takeshi Marumo, Shinichiro Yagi, Wakako Kawarazaki, Mitsuhiro Nishimoto, Nobuhiro Ayuzawa, Atsushi Watanabe, Kohei Ueda, Junichi Hirahashi, Keiichi Hishikawa, Hiroyuki Sakurai, Kunio Shiota, Toshiro Fujita. *J Am Soc Nephrol*. 26, 2388-97, 2015. DOI: 10.1681/ASN.2014070665、査読あり
5. Renal mechanisms of salt-sensitive hypertension: contribution of two steroid receptor-associated pathways. Mitsuhiro Nishimoto and Toshiro Fujita. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015; 308(5): F377-87. doi: 10.1152/ajprenal.00477.2013、査読あり

[学会発表] (計 25 件)

1. Toshiro Fujita. Angiotensin Gordon Conferences Vice Chair. Angiotensin: From Cell Biology and Signaling Networks to Novel Physiological

- Paradigms and Therapeutics, February 21-26, 2016, (Lucca, Italy)
2. Toshiro Fujita. American Heart Association (AHA) “ Mechanism of Salt-sensitive hypertension ”, 2015年11月8-10日(Orland, USA)
 3. Toshiro Fujita. International Symposium and Annual ADMIRE Cost Meeting ” Mineralocorticoid receptor and salt-sensitive hypertension ” 2015年10月9-12日(Zermatt, Switzerland)
 4. Toshiro Fujita. European Society of Hypertension “ IMPORTANCE OF DIETARY SALT INTAKE IN ANTI-ALBUMINURIC EFFECT OF AN ALDOSTERONE BLOCKER ” 2015年5月12-17日(Milan, Italy)
 5. Toshiro Fujita. Oriental Congress of Cardiology (OCC) “ Activation of Mineralocorticoid Receptor in Salt-Sensitive Hypertension - From Bench to Clinic ” 2015年9月11-13日(上海、中国)
 6. Toshiro Fujita. Chinese Academy of Sciences “ Activation of mineralocorticoid receptor in the heart and the kidney ” 2015年9月11-13日(上海、中国)
 7. Toshiro Fujita. Cardio Care Summit “ Aldosterone in DM: From heart failure to kidney disease ” 2015年4月10-12日(ホーチミン、ベトナム)
 8. Toshiro Fujita. Asian Pacific Society of Hypertension inviter speaker, “ Salt, Aldosterone and Hypertension ” and “ Potassium, Hypertension and Vascular disease ” 2015年6月6-8日(Bali, Indonesia)
 9. Toshiro Fujita. HAKATA Cardiovascular Conference “ Activation of Mineralocorticoid Receptor in Salt-Sensitive Hypertension-Bench to Clinic ” 2015年5月29-30日(福岡)
 10. Atsushi Watanabe, Takeshi Marumo, Wakako Kawarazaki, Mitsuhiro Nishimoto, Nobuhiro Ayuzawa, Daigoro Hirohama, Kohei Ueda, Hiroo Kumagai, Toshiro Fujita. Epigenetic abnormalities underlie increased expression of nuclear receptor PXR in diabetic kidney disease. Kidney Week 2015 ASN Annual Meeting, 2015年11月6日, San Diego Convention Center, USA.
 11. Kohei Ueda, Mitsuhiro Nishimoto, Wakako Kawarazaki, Nobuhiro Ayuzawa, Daigoro Hirohama, Atsushi Watanabe, Takeshi Marumo, Toshiro Fujita, The mechanism of blood pressure elevation in distal nephron-specific Hsd11b2 knockout mice, The 41st International Aldosterone Conference Aldosterone and Mineralocorticoids, March 30 - 31, 2016, The Revere Hotel Boston Common, USA
 12. 藤田敏郎 日本医師会 日本医師会医学賞受賞講演「高血圧の発症の分子メカニズム」2015年11月1日 東京
 13. 藤田敏郎 DOHAD 研究会「生活習慣病とエビジェネティクス」2015年7月31-8月1日(東京 昭和大学)
 14. 藤田敏郎 第79回日本循環器学会学術集会 Anti-albuminuric Effect of an Aldosterone Blocker in Non-diabetic Hypertensive Patients with Albuminuria:A Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Trial 2015年4月24-26日(大阪)
 15. 藤田敏郎 第79回日本循環器学会学術集会 Residual albuminuria induced by salt-induced activation of mineralocorticoid receptor in CKD patients receiving RAS inhibitors 2015年4月24-26日(大阪)
 16. 鮎澤 信宏、上田 浩平、広浜 大五郎、西本 光宏、河原崎 和歌子、渡邊 篤史、丸茂 文史、藤田 敏郎、遠位ネフロン特異的 Rac1 欠損マウスを用いた Rac1-ミネラルコルチコイド受容体(MR)経路の解析 第58回日本腎臓学会学術総会、2015年6月5-7日 名古屋国際会議場
 17. 西本光宏、大津洋、丸茂文史、河原崎和歌子、鮎澤信宏、上田浩平、広浜大五郎、渡邊篤史、藤田敏郎、Eplerenoneは塩分過剰摂取によるRA系阻害抵抗性腎障害を抑制する-EVALUATE試験サブ解析- 第58回日本腎臓学会学術総会、2015年6月5-7日 名古屋国際会議場
 18. 渡邊篤史 丸茂文史 河原崎和歌子 西本光宏 鮎澤信宏 広浜大五郎 上田浩平 熊谷裕生 藤田敏郎、近位尿細管の核内受容体Pxrは糖尿病腎症でエピゲノム変化を介して発現が更新する 第58回日本腎臓学会学術総会、2015年6月5-7日 名古屋国際会議場
 19. 丸茂文史、八木慎太郎、河原崎和歌子、西本光宏、鮎澤信宏、渡邊篤史、上田浩平、菱川慶一、櫻井裕之、藤田敏郎、糖尿病性腎症にみられるエビジェネティック異常は血糖治療に抵抗性を示す 第88回日本内分泌学会学術総会 2015年4月23日 ホテルニューオータニ 東京
 20. 西本光宏、大津洋、丸茂文史、河原崎和歌子、鮎澤信宏、上田浩平、広浜大五郎、渡邊篤史、藤田敏郎、MR拮抗薬は塩分過剰摂取によるRA系阻害抵抗性腎障害を抑制する-EVALUATE試験サブ解析- 第7回腎疾患と高血圧研究会 2015年7月18日 東京
 21. 西本光宏、水野理介、丸茂文史、河原崎和歌子、鮎澤信宏、広浜大五郎、上田浩

- 平、一色政志、藤田敏郎、STIM1 は血管内皮細胞において NO 産生を介して血圧調節に關与する 第 10 回高血圧と冠動脈疾患研究会 2015 年 12 月 19 日 東京
22. 藤田敏郎 2014 年 9 月 25-28 日 International Society of Nephrology (ISN) NEXUS Symposium, Brisbane, Australia, Plenary lecture "Renal Mechanisms of Salt-Sensitive Hypertension"
23. 丸茂丈史、八木慎太郎、河原崎和歌子、西本光宏、鮎澤信宏、渡邊篤史、菱川慶一、櫻井裕之、藤田敏郎、2014 年 7 月 4 日、横浜、第 57 回日本腎臓学会学術総会 糖尿病性腎症にみられる治療抵抗性エピジェネティック異常
24. 丸茂丈史、八木慎太郎、河原崎和歌子、西本光宏、鮎澤信宏、上田浩平、渡邊篤史、藤田敏郎、2014 年 7 月 12 日、東京、第 6 回腎疾患と高血圧研究会、糖尿病性腎症にみられる治療抵抗性 DNA メチル化異常
25. 広浜 大五郎、森 典子、小倉 彩世子、神保 りか、上竹 勇三郎、矢富 裕、南学 正臣、藤田敏郎、下澤 達雄、2014 年 7 月 4-6 日、横浜、第 57 回日本腎臓学会総会、腎除神経は SERCA2a 発現回復を介して心拡張障害を軽減させる

6. 研究組織

(1) 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 臨床エピジェネティクス講座・特任研究員、
名誉教授

研究者番号：10114125

(2) 研究分担者

丸茂 丈史 (MARUMO, Takeshi)

東京大学・先端科学技術研究センター 臨床エピジェネティクス講座・特任准教授

研究者番号：70265817