

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860627

研究課題名(和文)腎線維化に寄与する非翻訳RNAの同定およびその転写制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of novel transcriptional mechanisms and identification of non-coding RNAs contributing renal fibrosis.

研究代表者

三村 維真理 (MIMURA, IMARI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00727084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腎尿細管間質の線維化に寄与するエピジェネティックなメカニズムおよび因子を同定するため、遺伝子発現のヒストン抑制マークであるH3K27me3を阻害する役割を持つDznepを慢性腎不全モデルマウスに投与した。さらにレーザーマイクロダイセクションを用いて近位尿細管細胞のみを切りだし、高速シーケンサーによりRNAの網羅解析を施行した。その結果、慢性腎障害モデルマウス群およびDznep投与群において、発現が変動する線維化関連遺伝子およびlincRNAsを同定した。これらの実験結果からDznepがエピジェネティックな因子を変化させ、腎尿細管間質の線維化を軽減する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The main researcher of this project administered Dznep, which is one of inhibitors of histone repressive mark H3K27me3, to chronic kidney disease model mice in order to identify novel epigenetic mechanisms and factors which contribute to the reduction of tubulointerstitial fibrosis. I used laser captured microdissection to cut out only tubular cells from in vivo mice cortexes. I performed genome-wide analysis of RNA using high throughput sequencers. As a result, I identified changes of genes or lincRNAs expressions which are associated with renal fibrosis. These results suggested that there is a possibility that epigenetic factors driven by Dznep lead to amelioration of tubulointerstitial fibrosis.

研究分野：腎臓

キーワード：腎線維化 非翻訳RNA

1. 研究開始当初の背景

2012年最新の統計調査では、本邦で人工透析と腎移植を受ける人は30万人を突破し、総医療費30兆円のうち1兆円以上が腎不全代替医療に投入されている。このような日本の医療費を圧迫している状況を打開するために、慢性腎不全の進行を食い止める新たな治療法を見つけることは非常に重要な課題である。近年、エピジェネティクスによる遺伝子発現制御機構が次々に明らかとなってきた。慢性腎臓病の中でも腎尿細管間質領域の線維化は一度進行が進むと不可逆的な経過をたどる特徴があることから、エピジェネティクス制御機構の破綻が、長期的な腎線維化の進行に重要な役割を果たす遺伝子発現の変化とそれに伴う病態を引き起こしている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

慢性腎不全の進行には腎尿細管間質領域の慢性的な低酸素状態が増悪に寄与することが報告されてきた。本研究代表者は、慢性腎不全の進行にヒストン修飾酵素Ezh2(enhancer of zeste homolog 2)を阻害するDz nep(3-deazaneplanocin A)を慢性腎不全モデルマウスに2か月間投与すると腎臓の線維化が軽減されることを見出した。そこでLaser Capture Microdissection (LCM)によって尿細管細胞のみを切り出し、RNA-seqにより網羅的な遺伝子発現量の変化およびDz nepによって変化する非翻訳RNA(lincRNA)を同定し、腎尿細管間質の線維化軽減におけるエピジェネティックな分子メカニズムを明らかにすることを計画した。さらに近位尿細管細胞株を用いてin vitroにおいても低酸素およびDz nep刺激により変化する遺伝子群を網羅的に解析し、エピジェネティックな因子を標的とした新規治療薬の開発につながる研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

Dz nepを全身投与した際、尿細管細胞におけるH3K27me3修飾が減少することから腎臓の様々な種類の細胞の中でも、尿細管細胞のヒストン修飾状態がDz nepにより変化することで線維化の促進に関与する遺伝子発現が制御されている可能性が考えられた。そこで本研究代表者はLCMを用いて尿細管細胞のみを切り出し、RNA-seqによりその網羅的な遺伝子発現変化およびDz nep投与した際に変化する非翻訳RNA(lincRNA: long intergenic non-coding RNA)を同定した。次に、近位尿細管培養細胞株(HK2: human kidney-2)および正常ヒト近位尿細管上皮細胞(Normal Human Renal Proximal Tubule Epithelial Cells :RPTEC)株を用いて上記で同定された転写産物が低酸素およびDz nep刺激によりどのように変動するのか、RNA-seqにより解析した。

4. 研究成果

本研究代表者は、NCBIのデータベースに登録されているマウスのlincRNA総数3712個のうち、急性虚血再灌流障害後8週間の慢性腎障害が出現する時点で尿細管細胞において発現が低下するlincRNAは656個、Dz nepの投与によりvehicle投与に比べて発現が上昇するlincRNA407個を同定した。さらに、RNA-seqによって明らかとなった尿細管の遺伝子発現変化のうち、線維化関連遺伝子群(Col1a1; collagen 1 type1, Col3; collagen type3, Col4; collagen type4, MMP2; matrix metalloproteinase2, CTSL; cathepsin L, MMP9; metalloproteinase9, TIMP1; matrix metalloproteinase inhibitor 1, TIMP2; matrix metalloproteinase inhibitor 2, TIMP3; matrix metalloproteinase inhibitor 3)の発現変化に着目した。その結果、in vivo サンプルにおいて、慢性腎障害により発現が上昇するも

の、Dznep を継続投与することにより発現が低下する遺伝子群に TIMP1, TIMP2 などが含まれていた。さらに、in vitro のサンプルにおいても RNA-seq の結果を調べたところ、Dznep 投与に伴い発現が低下する遺伝子は 2 つの細胞株で共通して TIMP2 であった。TIMP2 は MMP2, MMP9 などのコラーゲン分解酵素を抑制する働きがあることが知られており、TIMP2 によりコラーゲンが蓄積することが報告されている。すなわち TIMP2 は線維化促進遺伝子群の一つである。Dznep を投与することにより in vivo においても in vitro においても線維化促進遺伝子 TIMP2 が抑制されることにより腎尿細管間質の線維化が軽減する可能性が考えられた。

本研究の成果により、慢性腎臓病という長年に渡り画期的な治療法のない疾患分野において、ヒストン修飾酵素阻害薬により線維化が軽減するという新しい知見が得られた。今後は、Dznep によってどのようなエピジェネティックな因子が TIMP2 の発現を抑制するのか、その分子メカニズムに着目して in vivo, in vitro の両方の側面から研究を遂行していく予定である。

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 5 件)

1. Nangaku M, Inagi R, Mimura I, Tanaka T. Epigenetic Changes Induced by Hypoxia-Inducible Factor: a Long Way Still To Go as a Target for Therapy? Journal of American Society of Nephrology. 26; 1478-1480, 2015
doi: 10.1681/ASN.2014121161
2. Mimura I. Evolution of epigenetics in kidney disease. Nihon Jinzo Gakkai Shi. 57; 241-247, 2015.

3. Mimura I, Tanaka T, Nangaku M. How the Target Hemoglobin of Renal Anemia Should Be. Nephron. 2015;131(3):202-9.
doi: 10.1159/000440849. Epub 2015 Sep 19.
4. Hirakawa Y, Yoshihara T, Kamiya M, Mimura I, Fujikura D, Masuda T, Kikuchi R, Takahashi I, Urano Y, Tobita S, Nangaku M. Quantitating intracellular oxygen tension in vivo by phosphorescence lifetime measurement. Sci Rep. 2015 Dec 8;5:17838.
doi: 10.1038/srep17838.
5. Mimura I. Epigenetic memory in kidney disease. Kidney International. 89; 274-277, 2016.
doi: 10.1016/j.kint.2015.12.026.

[学会発表](計 9 件)

1. 平川陽亮、三村維真理、吉原利忠、神谷真子、浦野泰照、飛田成史、南学正臣。演題名：りん光寿命測定を用いた腎の低酸素の検出と定量化 第 58 回日本腎臓学会 2015 年 6 月 5 日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
2. Yosuke Hirakawa, Toshitada Yoshihara, Mako Kamiya, Imari Mimura, Yasuteru Urano Seiji Tobita, Masaomi Nangaku. 演題名 :Detection and quantification of intracellular hypoxia of kidney by phosphorescence lifetime measurement using BTPDM1. 第 3 回低酸素研究会 2015 年 7 月 25 日 早稲田大学先端生命医科学センター(東京都新宿区)
3. 平川陽亮, 三村維真理, 吉原利忠, 神谷真子, 浦野泰照, 飛田成史, 南学正臣。演題名：りん光寿命測定を用いた生体内での尿細管細胞内低酸素の検出 第 6 回分子腎臓フォーラム 2015 年 9 月 5 日 グランフロント大阪(大阪府大阪市)

4. 平川陽亮, 吉原利忠, 神谷真子, 三村維真理, 田中真司, 田中哲洋, 浦野泰照, 飛田成史, 南学正臣. 演題名: りん光寿命測定を用いた腎臓尿細管細胞内酸素分圧の測定 第38回日本分子生物学会 2015年12月4日 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
5. 串田夏樹, 野村征太郎, 藤田隆教, 三村維真理, 南学正臣, 油谷浩幸. 演題名: 低酸素とTGF- β は、下流にあるIGFBP3を介して、尿細管上皮細胞にapoptosisを誘導する。 第38回日本分子生物学会 2015年12月1日 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
6. 三村維真理 演題名: Identification of novel microRNAs inhibiting tubulointerstitial fibrosis. Kidney Summit. 2015年12月20日 第一ホテル東京(東京都港区)
7. 三村維真理 演題名: 腎臓領域におけるエピジェネティクスの進展 第17回神田川腎セミナー 2016年1月29日 経団連会館(東京都千代田区)
8. Yosuke, Hirakawa, Imari, Mimura, Toshitada, Yoshihara, Mako, Kamiya, Yasuteru, Urano, Seiji, Tobita, Masaomi, Nangaku. Quantitating intracellular oxygen tension in kidney by phosphorescence lifetime measurement. American Society of Nephrology. 2015年11月6日 SanDiego(アメリカ合衆国)
9. Yosuke Hirakawa, Imari Mimura, Toshitada Yoshihara, Mako Kamiya, Shinji Tanaka, Tetsuhiro Tanaka, Reiko Inagi, Yasuteru Urano, Seiji Tobita, Masaomi Nangaku. Estimation of intracellular oxygen concentration in diabetic kidney by phosphorescence lifetime measurement. Keystone Symposia 2015. 2015年10月26日 ウェスティン都ホテル京都(京都府京都市)

[図書](計 1件)

1. Imari Mimura, Masaomi Nangaku. Springer. Biomarkers in Diseases; Methods, Discoveries and Applications, Biomarkers in Kidney Disease. 'Next-Generation Sequencing(NGS) in biomarker discovery and applications in Nephrology' 2015. 21ページ

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

該当するものなし

6. 研究組織

(1)研究代表者

三村 維真理(Imari Mimura)

東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科
助教

研究者番号: 00727084

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし