

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09735

研究課題名(和文)塩分負荷による腎エピゲノム変容の高血圧発症における意義の解析

研究課題名(英文)Significance for epigenomic regulation of renal gene expressions in the onset of salt-induced hypertension.

研究代表者

宮下 和季(MIYASHITA, Kazutoshi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任准教授

研究者番号：50378759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：申請者の教室では、高血圧自然発症ラット(SHR)に一過性の塩分負荷を与えると、塩分負荷中止後も血圧が持続的に上昇する、ソルトメモリー現象を見出した。本研究では、塩分負荷中止後も持続する血圧上昇に、クロマチンのエピゲノム修飾が関与する可能性について検討した。一過性の塩分負荷後に、腎細動脈特異的なエピゲノム変容が持続しており、腎細動脈局所におけるヒストンアセチル化を介したMMP2の発現亢進が中膜肥厚を促進し、レニン分泌の亢進と持続的な血圧上昇に関与した可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者の研究室では、高血圧自然発症ラット(SHR)に一過性の塩分負荷を与えると、塩分負荷中止後も血圧が持続的に上昇することを見出し、腎細動脈の中膜肥厚に伴うレニン分泌の亢進が、血圧上昇の本態となる可能性を指摘した[Oguchi Hypertension. 2014]。本研究では腎臓のエピゲノム変容について解析し、塩分負荷に伴う腎細動脈リモデリングや、Na輸送の変容に関与するクロマチンエピゲノム修飾を同定した。この知見は、腎のエピゲノム変容を治療標的とした、新しい高血圧治療戦略の開発につながるものである。

研究成果の概要(英文)：We found a salt memory phenomenon in which spontaneously hypertensive rats (SHR) were subjected to transient salt loading and the systolic blood pressure was persistently increased even after discontinuation of the salt loading. In the present study, we investigated the significance for epigenetic modification of chromatin in persistent increase in the blood pressure after salt loading. Following transient salt loading, renal arteriole-specific epigenetic alterations persist, and histone acetylation-mediated MMP2 upregulation in the renal arterioles might promote medial hypertrophy which lead to renin hypersecretion and persistent elevation in the blood pressure.

研究分野：内分泌学、代謝学、高血圧学

キーワード：高血圧 塩分負荷 高血圧自然発症ラット 記憶現象 エピゲノム ヒストンアセチル化 腎細動脈 MMP2

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでから、ナトリウム利尿ペプチドやアンジオテンシン II など、血圧を調節する血管ホルモンによるエネルギー代謝制御と、血管ホルモンの肥満・糖尿病発症における意義について検討してきた[Miyashita *Diabetes*. 2009, Mitsuishi *Diabetes*. 2009]。血管ホルモンによるエネルギー代謝の制御が、ヒストンアセチル化や DNA メチル化などのエピゲノム修飾を介した遺伝子発現変化により生じる可能性につき検討し、最近では、消化管ホルモンであるグレリンが、ミトコンドリア量を規定する転写共役因子である、Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator (PGC)-1 α の遺伝子脱メチル化を介して、骨格筋ミトコンドリアを活性化して身体能力を改善することを見出した[Tamaki *Endocrinology*. 2015]。また、5/6 腎摘によるマウスの慢性腎臓病(CKD)が、TNF- α などの炎症性サイトカインの増加を介して、エピゲノム変容の原因となることを見出した[Tamaki *Kidney Int*. 2014]。このことから申請者は、ホルモン、サイトカイン、代謝産物など、全身を循環する液性因子が、クロマチンのエピゲノム修飾を介して遺伝子発現に影響を与えるとの仮説のもと、液性因子の生活習慣病発症・進展に関する意義に関する検討を進めている。本研究においては、高血圧発症に関与する、環境要因によるエピゲノム変容について検討した。

2. 研究の目的

ある一定期間与えられた負荷の影響が、負荷消失後も残存して疾患発症に関与する現象が、“記憶現象(memory phenomenon)”として心血管病の大規模臨床試験において観察され、生活習慣病発症・進展の新たなメカニズムとして注目されている。環境因子の影響を遺伝子に刻みこむ、DNA メチル化やヒストンアセチル化などのエピゲノム修飾が、記憶現象の分子本態として想定されている。本研究では、申請者らの研究室でこれまで検討した、高血圧自然発症ラット(SHR)への一過性の塩分負荷にて持続的な血圧上昇をきたす“ソルトメモリー現象”における[Oguchi *Hypertension*. 2014]、腎臓のエピゲノム変容について解析した。塩分負荷に伴う腎細動脈リモデリングや、Na 輸送の変容をきたすエピゲノム修飾を明らかにすることで、新しい高血圧治療標的を同定し、新規治療戦略の開発を目指す。

3. 研究の方法

エピゲノムの観点から遺伝子発現制御を検討する研究は、発生・分化、発がん領域を中心に盛んに行われ、標準的な解析手法が確立している。本研究ではその手法を高血圧発症過程の解析に応用し、高血圧発症の原因となるエピゲノム修飾を明らかにする。発生・発がんでのエピゲノム変容のステージング同様、塩分負荷マウスにおける高血圧発症の初期、中期、末期を特徴づける腎臓の遺伝子発現変容と、その発現変容の形成に関与するクロマチンエピゲノム修飾を明らかにする。腎 Na 輸送の異常に関与するエピゲノム修飾を明らかにするとともに、エピゲノム治療の可逆性と治療効果の持続性を検討することで、高血圧の退行を目指し、高血圧の各ステージに最適化した、新規高血圧治療の開発を目指す。

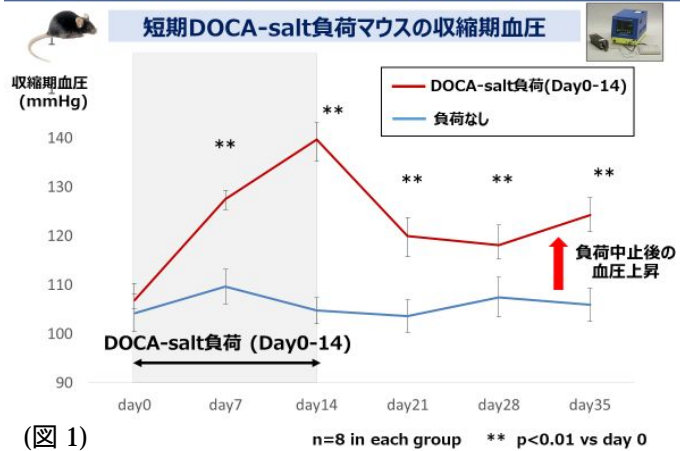
4. 研究成果

申請者の研究室では、高血圧自然発症ラット(SHR)に一過性の塩分負荷を与えると、塩分負荷中止後も血圧が持続的に上昇することを見出し、腎細動脈の中膜肥厚に伴うレニン分泌の亢進が、血圧上昇の本態となる可能性を指摘した[Oguchi *Hypertension*. 2014]。持続的な遺伝子発現の変容に、エピゲノム修飾が関与することが注目されていることから、本研究では、塩分負荷中止後も持続する血圧上昇に、ヒストンアセチル化が関与する可能性について検討した。

C57bl6 マウスに、酢酸デオキシコルチコステロン(DOCA)と飲水 1%NaCl を 2 週間負荷したモデルを短期負荷モデル、片側腎摘後に DOCA と 1%NaCl を 8 週間負荷したモデルを長期負荷

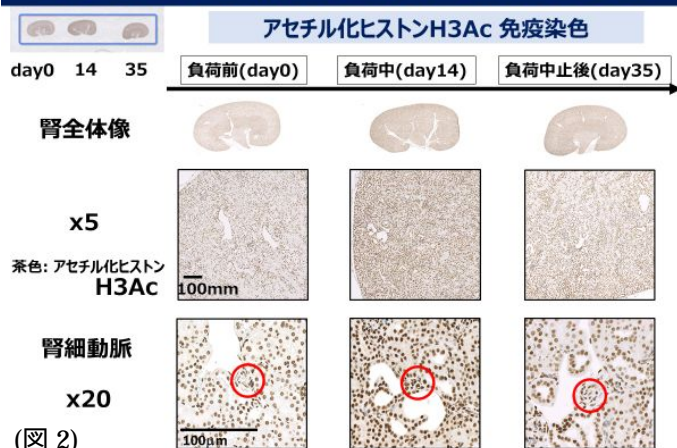
モデルとして、塩分負荷中止後3ないし6週間マウスを観察して、血圧、腎病理、遺伝子発現等を検討した。アセチル化ヒストン抗体による免疫染色にて、腎臓各部位におけるヒストンアセチル化を評価し、レーザーダイセクション法(LCM)にて腎細動脈、系球体、尿細管を回収して、各部位における遺伝子発現を定量的PCR法にて解析した。短期負荷モデルにおける2週間のDOCA-salt負荷により、腎細動脈の中膜肥厚と血圧上昇が生じ、負荷中止後もこれらの変化は持続した(図1)。短期負荷モデルにおいて、尿細管のヒストンアセチル化は負荷中に亢進したが、負荷中止後にその亢進は消失した。腎細動脈では負荷中のアセチル化亢進が負荷中止後も持続した(図2)。中膜肥厚に与する matrix metalloproteinase 2 (MMP2)の発現亢進は、腎細動脈では負荷中止後も持続したが、それ以外の部位では負荷中止後に消失した。長期負荷モデルにおけるDOCA-salt負荷では、負荷中止後の血圧上昇が、短期モデルに比して顕著であった。このことより、塩分負荷中止後も持続する血圧上昇に、腎細動脈局所におけるヒストンアセチル化を介したMMP2発現亢進が関与すると考えられた。すなわち、塩分負荷に伴う腎細動脈特異的なエピゲノム変容が「臓器の記憶」となり、高血圧発症に関与する可能性が示唆された。これらの知見について、“Epigenetic modulation of renal arterioles induced by DOCA-salt loading in mice.”のタイトルで、論文投稿を準備中である。

一過性のDOCA-salt負荷に伴う収縮期血圧の上昇



(図1)

DOCA-salt負荷に伴うヒストンアセチル化の変化



(図2)

すなわち、塩分負荷に伴う腎細動脈特異的なエピゲノム変容が「臓器の記憶」となり、高血圧発症に関与する可能性が示唆された。これらの知見について、“Epigenetic modulation of renal arterioles induced by DOCA-salt loading in mice.”のタイトルで、論文投稿を準備中である。

高血圧は加齢とともに発症頻度が増加する加齢性疾患である。NAD依存性脱アセチル化酵素であるSirt3は、加齢とともに発現が低下することから、加齢性疾患発症との関連が注目されている。これまでにSirt3は、肺高血圧症発症との関連が報告されているが、収縮期血圧に与える影響は定かではない。野生型マウスを用いた基礎検討では、加齢に伴うSirt3発現の低下は、心臓・腎臓と比較して腸管で顕著であった。我々は加齢に伴う血圧上昇に、加齢に伴うSirt3発現低下が関するとの仮説のもと、Sirt3全身欠損マウスの血圧を評価した。6週令の若齢Sirt3KOマウスは野生型マウスと比較して血圧が低値で推移した。すなわち、当初の仮説と反してSirt3の発現低下は血圧低下に関与しており、またSirt3欠損状態においては加齢に伴う血圧上昇が加速した。体重が両群同等であるにも関わらず、Sirt3KOマウスではインピーダンス法で測定した体内水分量が低値であった。Sirt3KOマウスでは尿中Na排泄量が有意に低いのに対し、便中Na排泄量は有意に高値で、また、塩分喪失で亢進する腎臓のレニン発現も有意に高値であった。一方、小腸塩分吸収を担う分子であるsodium-hydrogen exchanger 3 (NHE3)の遺伝子発現はSirt3KOマウスで有意に低下していた。以上よりNHE3低下に伴う便中Na排泄の増加が、Sirt3KOマウスにおける体内水分量と血圧低下の一因と考えられた。これらの結果より、高齢者にみられる塩分喪失に、加齢に伴うSirt3発現低下が関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Itoh Hiroshi, Hayashi Kaori, Miyashita Kazutoshi	4. 巻 42
2. 論文標題 Pre-emptive medicine for hypertension and its prospects	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 301 ~ 305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-018-0177-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Uchiyama Kiyotaka, Washida Naoki, Morimoto Kohkichi, Muraoka Kaori, Kasai Takahiro, Yamaki Kentaro, Miyashita Kazutoshi, Wakino Shu, Itoh Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Home-based Aerobic Exercise and Resistance Training in Peritoneal Dialysis Patients: A Randomized Controlled Trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2632~2632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-39074-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Uchiyama Kiyotaka, Washida Naoki, Muraoka Kaori, Morimoto Kohkichi, Kasai Takahiro, Yamaki Kentaro, Miyashita Kazutoshi, Wakino Shu, Itoh Hiroshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Exercise Capacity and Association with Quality of Life in Peritoneal Dialysis Patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Peritoneal Dialysis International	6. 最初と最後の頁 66 ~ 73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3747/pdi.2018.00075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Itoh Hiroshi, Kurihara Isao, Miyashita Kazutoshi	4. 巻 41
2. 論文標題 Organ memory: a key principle for understanding the pathophysiology of hypertension and other non-communicable diseases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 771 ~ 779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41440-018-0081-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Chikako, Miyashita Kazutoshi, Mitsuishi Masanori, Sato Masaaki, Fujii Kentaro, Inoue Hiroyuki, Hagiwara Aika, Endo Sho, Uto Asuka, Ryuzaki Masaki, Nakajima Motowo, Tanaka Tohru, Tamaki Masanori, Muraki Ayako, Kawai Toshihide, Itoh Hiroshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Treatment of sarcopenia and glucose intolerance through mitochondrial activation by 5-aminolevulinic acid	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-03917-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tamaki M, Miyashita K, Hagiwara A, Wakino S, Inoue H, Fujii K, Fujii C, Endo S, Uto A, Mitsuishi M, Sato M, Doi T, Itoh H.	4. 巻 64
2. 論文標題 Ghrelin treatment improves physical decline in sarcopenia model mice through muscular enhancement and mitochondrial activation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Endocr J.	6. 最初と最後の頁 S47-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.64.S47.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Itoh H, Kurihara I, Miyashita K, Tanaka M.	4. 巻 40
2. 論文標題 Clinical significance of 'cardiometabolic memory': a systematic review of randomized controlled trials.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hypertens Res.	6. 最初と最後の頁 526-534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/hr.2016.192.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 藤井健太郎, 宮下和季, 久保亜紀子, 佐藤正明, 萩原あいか, 井上博之, 竜崎正毅, 末松誠, 伊藤裕
2. 発表標題 急性虚血性腎障害におけるフェブキソスタットによるATPブーストを介した腎保護メカニズムのマスイメージングを用いた可視化解析
3. 学会等名 第41回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤井健太郎, 宮下和季, 久保亜紀子, 佐藤正明, 萩原あいか, 井上博之, 竜崎正毅, 末松誠, 伊藤裕
2. 発表標題 A semi-quantitative mass imaging technique revealed region-specific alteration of adenylates in the murine kidney after transient ischemia and reno-protective effect of febuxostat by ameliorating ATP levels in the cortex.
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤井健太郎, 宮下和季, 久保亜紀子, 佐藤正明, 萩原あいか, 井上博之, 竜崎正毅, 末松誠, 伊藤裕
2. 発表標題 キサンチンオキシダーゼ阻害による虚血腎保護メカニズムのマスイメージングを用いた可視化解析
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Miyashita, K. Fujii, A. Kubo, M. Sato, A. Hagiwara, H. Inoue, M. Suematsu, H. Itoh
2. 発表標題 Febuxostat exerted reno-protective effects after transient ischemia by promoting ATP recovery in the cortex: visualization of renal adenine nucleotides by an imaging mass-spectrometry technique
3. 学会等名 27th Scientific Meeting of International Society of Hypertension (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Miyashita, K. Fujii, A. Kubo, M. Sato, A. Hagiwara, H. Inoue, M. Suematsu, H. Itoh
2. 発表標題 A mass imaging technique revealed a reno-protective effect of the xanthine oxidase inhibitor febuxostat in the ischemic kidney by promoting ATP recovery in the cortex
3. 学会等名 28th Scientific Meeting of European Society of Hypertension (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Miyashita, K. Fujii, A. Kubo, M. Sato, A. Hagiwara, H. Inoue, M. Suematsu, H. Itoh
2. 発表標題 A SEMI-QUANTITATIVE IMAGING MASS SPECTROMETRY REVEALED THE RENO-PROTECTIVE EFFECT OF FEBUXOSTAT IN THE ISCHEMIC KIDNEY BY PROMOTING ATP RECOVERY IN THE CORTEX.
3. 学会等名 55th ERA-EDTA congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 2. 宮下 和季, 井上 博之, 佐藤 正明, 萩原 あいか, 藤井 健太郎, 遠藤 翔, 宇都 飛鳥, 竜崎 正毅, 伊藤 裕
2. 発表標題 一過性のDOCA-salt負荷による腎細動脈ヒストンアセチル化の亢進が高血圧発症に与える意義の解析
3. 学会等名 第25回ステロイドホルモン学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 5. 井上 博之, 宮下 和季, 佐藤 正明, 萩原 あいか, 藤井 健太郎, 遠藤 翔, 宇都 飛鳥, 竜崎 正毅, 伊藤 裕
2. 発表標題 DOCA-salt高血圧マウスにおける血管シアーストレスの腎細動脈ヒストンアセチル化における意義
3. 学会等名 第40回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 12. 井上 博之, 宮下 和季, 佐藤 正明, 萩原 あいか, 藤井 健太郎, 竜崎 正毅, 伊藤 裕
2. 発表標題 塩分負荷に伴う腎臓各部位におけるヒストンアセチル化の高血圧発症における意義
3. 学会等名 第60回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 H. Inoue, K. Miyashita, M Sato, A. Hagiwara, K. Fujii, H. Itoh
2. 発表標題 HISTONE ACETYLATION IN EACH SEGMENT OF THE KIDNEY AFTER TRANSIENT SALT LOADING IN MICE AND THE SIGNIFICANCE FOR THE ONSET OF PERSISTENT HYPERTENSION.
3. 学会等名 54th ERA-EDTA congress (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 宮下 和季、南学正臣、伊藤裕、太田健、小澤敬也、下村伊一郎、田中章景、千葉勉、伴慎太郎、平井豊博、深川雅史、福田恵一、藤田次郎、三森経世、持田智、山田俊幸、山本和利、塩沢昌英ら	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 3672
3. 書名 内科学教科書第9版 血圧異常、高血圧	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	佐藤 正明 (SATO Masaaki)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・研究員 (32612)	
研究協力者	井上 博之 (INOUE Hiroyuki)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教 (32612)	
研究協力者	竜崎 正毅 (RYUZAKI Masaki)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教 (32612)	

6. 研究組織(つづき)

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	萩原 あいか (HAGIWARA Aika)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教 (32612)	
研究協力者	藤井 健太郎 (FUJII Kentaro)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教 (32612)	
研究協力者	藤井 千華子 (FUJII Chikako)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教 (32612)	
研究協力者	遠藤 翔 (ENDO Sho)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教 (32612)	
研究協力者	宇都 飛鳥 (UTO Asuka)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教 (32612)	
研究協力者	田蒔 昌憲 (TAMAKI Masanori)	徳島大学・医学部腎臓内科・助教 (16101)	
研究協力者	木内 謙一郎 (KINOUCHI Kenichiro)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教 (32612)	
研究協力者	伊藤 裕 (ITOH Hiroshi)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授 (32612)	