

令和元年6月14日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15466

研究課題名（和文）1細胞解析法を用いた糖尿病性腎症でのエピゲノム異常成立機構の解明

研究課題名（英文）Exploration of mechanisms involved in epigenetic abnormality in diabetic kidney disease using single cell analysis

研究代表者

丸茂 丈史（Marumo, Takeshi）

東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授

研究者番号：70265817

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病発症早期の血糖コントロールは体に記憶されており、後年になって糖尿病性腎症の進展に影響するが、最近エピジェネティクスが記憶の保持に関わることが示唆されている。エピジェネティクスは細胞ごとに異なるため一細胞解析技術を応用することにより詳細な解明が可能である。マウスの検討により、核内受容体Pxrや線維化因子Tgf-betaなどの遺伝子にDNAメチル化異常が生じており新たな治療標的になることが明らかになった。ヒトの検討により、腎臓の構成成分に特徴的なDNAメチル化パターンを尿診断に用いることにより、腎臓機能低下を診断可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎症は透析原因疾患の第一位であり、新たな診断・治療法を開発する必要がある。記憶の保持に関わるエピジェネティクスの観点から検討することにより、糖尿病性腎症の発症と進行に関わる重要な経路が解明できると思われた。本研究でその候補となる複数の経路が明らかにされ、ヒトでの実証と病的意義の証明が今後必要である。さらに、糖尿病症例の尿DNAメチル化解析が、新たな尿診断の手法になる可能性を提示することができ、エピジェネティック尿検査の実現性について今後検討を進める予定である。

研究成果の概要（英文）：The levels of blood glucose in the early stage of diabetes have been shown to determine the development of diabetic kidney disease (DKD) later in life. Epigenetic mechanisms are suggested to be involved in this memory phenomenon. We investigated the possibility to utilize epigenetic information of the kidney for new diagnosis and treatment of DKD. We found nuclear receptor Pxr and fibrogenic factor TGF-beta are demethylated in the kidneys of diabetic mice, revealing the candidates of therapeutic targets. We also showed that the levels of kidney signature DNA methylation in urine sediment correlate with kidney function decline in diabetic patients. Epigenetic urinalysis may serve as a novel diagnostic strategy for DKD.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：糖尿病性腎症 DNAメチル化 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大規模臨床試験により、糖尿病初期の血糖コントロールが記憶に残り、後年血糖レベルの差がなくなってからも糖尿病性腎症の進展に影響を及ぼし続ける、いわゆるメモリー現象があることが示された (UKPDS および EDIC 試験)。臓器特異的な遺伝子発現に代表されるように、エピジェネティクスによって制御される表現系は安定的なことから、エピゲノム異常がメモリー現象に関わると考えられ注目されている。わたしたちはこれまでに腎臓エピゲノムの異常が様々な腎障害に関わることを示し、糖尿病性腎症マウスを用いて経時的にエピゲノム異常が重層化し DNA メチル化異常にいたることを見出した。一度生じた DNA メチル化は血糖治療でも戻らず、メモリー減少の治療抵抗性の原因になっていることが示唆された。

1 細胞解析は、幹細胞研究や腸管の稀少な内分泌細胞種の発見、脳での幹細胞の虚血への反応の解析に用いられ、病態生理の精緻な解明に有用である。腎臓は多種類の細胞から構成されているため 1 細胞解析の利用価値は高く、正常および異常 DNA メチル化を腎臓で検討するうえで、有用な解析手段になると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、糖尿病性腎症の新たな診断・治療法の開発をめざして、エピゲノム異常とその成立機構ならびにヒト腎臓エピゲノムを解明することを目的とした。エピゲノムは発生期に大きく変化し、臓器特異的な遺伝子発現に重要な役割をはたす。なかでも DNA メチル化は遺伝子発現を固定化し、恒常的な細胞の性質を規定する。最近、血液を中心に、細胞種の構成変化を考慮にいれることが DNA メチル化解析には必要であることが認識されるようになった (Hum Mol Genet 26: R216, 2017)。腎臓は複雑な臓器で多種類の細胞から構成されており、細胞種ごとに DNA メチル化パターンは異なる。そこで、1 細胞レベルでの解析技術を用いて糖尿病性腎症の DNA メチル化異常の成立過程を明らかにし、その結果に基づいて新たな診断・治療方法を開発することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 正常マウス (db/m) 近位尿細管細胞の mRNA プロファイルの 1 細胞解析による解明

近位尿細管細胞を申請者らの先行論文に用いた手法により (J Am Soc Nephrol 2015)、ソーター ARIA III で 1 細胞ごとに分取した。超微量 RNA 用の SMART-Seq v4 RNA Kit を用いて cDNA を調整し、real time PCR により、これまでに明らかにした DNA メチル化異常を呈する Agt, Hgf 受容体などの遺伝子ならびに糖尿病・代謝関連遺伝子について mRNA 発現を解析し 1 細胞プロファイリングを行った。

(2) ソーターによる近位尿細管細胞の回収による DNA メチル化異常の解明

正常マウス (db/m) および、糖尿病マウス (db/db) の近位尿細管細胞をソーターで分離し、DNA メチル化を比較検討した。得られた異常遺伝子 PXR の下流のシグナルについて培養細胞・マウスにアゴニストを添加あるいは、siRNA を投与することによって検討した。さらに、得られた下流遺伝子の発現が糖尿病マウス腎臓で上昇していることを確認した。

(3) 初代培養による糸球体メサンギウム細胞の DNA メチル化異常の解明

正常マウス (db/m) および、糖尿病マウス (db/db) から糸球体を単離し、メサンギウム細胞を培養し、DNA メチル化を比較検討した。得られた異常遺伝子 TGF-beta に対する転写因子の付着状況をクロマチン沈降法で解析して DNA メチル化の転写に対する影響を調べた。また、糖尿病マウスに DNA メチル化薬として作用する葉酸を投与して TGF-beta の脱メチル化が予防可能か検討した。

(4) レーザーマイクロダイセクションによるヒト腎臓の解析

腎臓がんで腎臓摘出した症例から、正常腎臓部分を採取して切片を作成した。レーザーマイクロダイセクションで構成細胞ごとに採取し、網羅的解析および、マウスからの外挿から近位尿細管に特異的に変化する遺伝子を明らかにした。近年、正常 DNA メチル化パターンを臓器のマーカースとして臓器障害を診断する手法が開発されるようになった (PNAS 113, E1826, 2016)。しかし、腎臓 DNA メチル化マーカースを用いた検討はされておらず、今回明らかにした近位尿細管に特異的な DNA メチル化値を尿中で解析することにより、新たな腎臓障害マーカースとして利用できる可能性について検討を進めた。

明らかにした特異的 DNA メチル化パターンを近位尿細管のマーカースすることにより、糖尿病患者の尿中に障害されて落下する尿細管量を反映して、腎機能の悪化と関連するかどうか検討した。さらに、糖尿病患者を eGFR 変化量の 25 パーセントイル値を閾値として腎機能安定群と悪化群に分け、メチル化マーカースで層別化能が改善するか解析した。

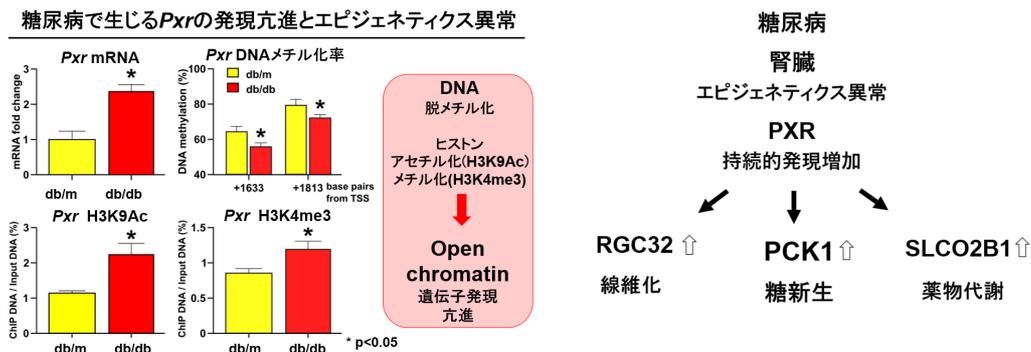
4. 研究成果

(1) 近位尿細管細胞の mRNA の 1 細胞解析は可能であるものの、発現量が比較的高い遺伝子のみに限られることが明らかになった。DNA メチル化異常を呈する遺伝子は必ずしも発現量は高くないものも含まれていたため、1 細胞解析技術に準拠したサブ populations の解析を進

めることとし、ソーターによる近位尿細管細胞のマウスの解析、メサンギウム細胞の初代培養によるマウスの解析、レーザーマイクロダイセクションによるヒト腎臓の解析を進めた。

(2) 糖尿病マウス尿細管での核内遺伝子 Pxr の脱メチル化

db/db マウスの近位尿細管を用いた検討で核内遺伝子 Pxr が脱メチル化していることを見出した。DNA の脱メチル化は、ヒストン H3K9 アセチル化と H3K4me3 メチル化を伴い Pxr 遺伝子部位でクロマチンが緩んで発現が上昇していることが明らかになった。Pxr は脱メチル化を伴って発現が糖尿病で増加していたが、腎臓での Pxr の下流経路は不明であった。そこで、Pxr アゴニストを正常マウスに投与し、腎臓を解析した結果、線維化に関連する Rgc32、糖新生に関わる Pck1、薬物代謝に関わる Slco2b1 などの遺伝子の発現を刺激することが明らかになった。これらの遺伝子は糖尿病で増加しており糖尿病では Pxr の脱メチル化が生じ線維化・糖新生が過剰に刺激されることが示唆された。PXR とその下流経路は糖尿病性腎症の新たな治療標的になる可能性がある(Am J Physiol 314, F551, 2018)。



(3) 糖尿病マウス系球体メサンギウムでの TGF-beta の脱メチル化

db/db マウスのメサンギウムを用いた検討では、線維化因子 TGF-beta が脱メチル化していることを見出した。脱メチル化が生じた遺伝子部位は、転写因子 USF-1 の付着部位であり、糖尿病では脱メチル化することにより、クロマチンが緩んだ結果、USF-1 が付着しやすくなり転写が刺激され TGF-beta の発現が継続的に増加すると考えられた。通常の血糖治療では、TGF-beta の脱メチル化は予防できないものの、メチル化供与薬である葉酸を糖尿病マウスに投与すると TGF-beta の脱メチル化と発現増加は抑制され、DNA メチル化自体が治療標的となりうることを示された (Sci Rep 8, 16338, 2018)。

(4) ヒト腎臓の近位尿細管特異的 DNA メチル化のマーカーとしての有用性

マイクロダイセクションで分取したヒト尿路系組織の DNA メチル化を検討した結果、G6PC 遺伝子および、遺伝子 A の中にあるシトシンが、近位尿細管細胞で脱メチル化し、糸球体、遠位尿細管、髄質内層および膀胱上皮ではメチル化していることを見出した。G6PC 遺伝子および、遺伝子 A のメチル化値は近位尿細管のマーカーになると思われた。

これらの遺伝子のメチル化の値を、尿沈渣中で測定し、障害して尿中に落下する尿細管のマーカーとして利用できるか検討したところ、糖尿病患者の尿沈渣中で G6PC のメチル化値と遺伝子 A のメチル化値は相関し、尿中に落下する近位尿細管細胞の量を反映している結果と思われた。さらに、臨床情報との関連解析の結果、遺伝子 A の DNA メチル化値は eGFR の年間変化量と相関した。この結果から、尿中の遺伝子 A のメチル化値により、糖尿病患者のなかで腎機能が悪化している症例を層別化できる可能性が考えられた。

腎機能悪化の危険因子により腎機能安定群と悪化群の層別化する判別能を検討した結果、eGFR と尿中アルブミン値のみで層別化するよりも、遺伝子 A のメチル化を加えたほうが、受信者動作特性曲線の曲線下面積は増加し、category-free NRI と IDI は有意に改善し、層別化能が改善することが明らかになった。以上から、尿中 DNA メチル化の測定が腎機能悪化のためのバイオマーカーとなる可能性が示唆された。最近、アルブミン尿が出現せずに腎機能悪化が進む糖尿病症例が増えており、尿細管障害を DNA メチル化により診断する本法は、見逃されている症例を鑑別するのに役立つ可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

1. Watanabe A, Marumo T, Kawarazaki W, Nishimoto M, Ayuzawa N, Ueda K, Hirohama D, Tanaka T, Yagi S, Ota S, Nagae G, Aburatani H, Kumagai H, Fujita T: Aberrant DNA methylation of pregnane X receptor underlies metabolic gene alterations in the diabetic kidney. 査読あり *Am J Physiol Renal Physiol* 314: F551-F560, 2018, doi: 10.1152/ajprenal.00390.2017
2. Oba S, Ayuzawa N, Nishimoto M, Kawarazaki W, Ueda K, Hirohama D, Kawakami-Mori F,

Shimosawa T, Marumo T, Fujita T: Aberrant DNA methylation of Tgfb1 in diabetic kidney mesangial cells. 査読あり *Sci Rep* 8, 16338, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-34612-3

3. Kawakami-Mori F, Nishimoto M, Rehemian L, Kawarazaki W, Ayuzawa N, Ueda K, Hirohama D, Kohno D, Oba M, Shimosawa T, Marumo T, Fujita T: Aberrant DNA methylation of hypothalamic angiotensin receptor in prenatal programmed hypertension. 査読あり *JCI Insight* 3(21), e95625, 2018, doi: 10.1172/jci.insight.95625
4. Hirohama D, Ayuzawa N, Ueda K, Nishimoto M, Kawarazaki W, Watanabe A, Shimosawa T, Marumo T, Shibata S, Fujita T: Aldosterone is essential for angiotensin II-induced upregulation of pendrin. 査読あり *J Am Soc Nephrol* 29: 57-68, 2018, doi: 10.1681/ASN.2017030243
5. Ueda K, Nishimoto M, Hirohama D, Ayuzawa N, Kawarazaki W, Watanabe A, Shimosawa T, Loffing J, Zhang MZ, Marumo T, Fujita T: Renal dysfunction induced by kidney-specific gene deletion of Hsd11b2 as a primary cause of salt-dependent hypertension. 査読あり *Hypertension* 70, 111-118, 2017, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08966

〔学会発表〕(計 30 件)

1. 丸茂丈史: 糖尿病性腎症とエピゲノム あらたなバイオマーカーとなりうるか? 第 25 回日本未病システム学会学術総会シンポジウム 2018 年
2. 丸茂丈史: 全ライフコースにおける高血圧と糖尿病性腎症に関わるエピジェネティクス機構 第 13 回 Vascular Biology Innovation に関する研究助成第 13 回研究発表会 教育講演 2018 年
3. 藤田敏郎、丸茂丈史: エピゲノム情報に基づく新しい腎臓病治療 第 61 回日本腎臓学会学術総会 シンポジウム 2018 年
4. 丸茂丈史、下澤達雄、河原崎和歌子、西本光宏、鮎澤信宏、広浜大五郎、上田浩平、佐藤敦久、渥美義仁、星野純一、乳原善文、藤田敏郎: 腎臓特異的 DNA メチル化を尿中マーカーとした糖尿病性腎症の尿細管障害診断法 第 61 回日本腎臓学会学術総会 2018 年
5. 丸茂丈史、下澤達雄、河原崎和歌子、西本光宏、鮎澤信宏、広浜大五郎、上田浩平、渡邊篤史、星野純一、乳原善文、藤田敏郎: 特異的 DNA メチル化 signature を用いた糖尿病性腎症の尿細管障害診断 第 60 回日本腎臓学会学術総会、2017 年
6. 渡邊篤史、丸茂丈史、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: 糖尿病性腎症でエピゲノム異常をきたす核内受容体 PXR は腎糖新生を調整する 第 60 回 日本腎臓学会学術総会、2017 年
7. 大庭成喜、広浜大五郎、鮎澤信宏、西本光宏、河原崎和歌子、上田浩平、下澤達雄、丸茂丈史、藤田敏郎: 糖尿病腎メサンギウム細胞の DNA メチル化異常による TGF β 発現増加を RA 系阻害薬は抑制する 第 40 回日本高血圧学会総会 シンポジウム 2017 年
8. 丸茂丈史: Therapeutic strategy against diabetic kidney disease based on the epigenetic information of the kidney. 第 90 回日本薬理学会年会 年会企画シンポジウム 糖尿病性腎症に対する未来医療を目指した最先端研究、2017 年
9. 丸茂丈史、藤田敏郎: 腎臓エピゲノム情報に基づく生活習慣病に対する治療戦略. 第 39 回日本高血圧学会総会、2016 年

〔図書〕(計 3 件)

1. 丸茂丈史: 「DKD の基礎、エピジェネティック異常」腎と透析 84, 185-189, 2018
2. 丸茂丈史: 「糖尿病性腎症におけるエピジェネティック異常」医学のあゆみ 260(8) 674-675, 2017
3. 丸茂丈史、藤田敏郎: 【エピゲノム研究】第 3 章 疾患エピゲノム研究 高血圧・腎疾患のエピゲノム異常 「環境因子とメタボリックメモリー」実験医学増刊. 34:128-33, 2016

〔産業財産権〕なし

〔その他〕

ホームページ: 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

<http://www.c-epi.rcast.u-tokyo.ac.jp/>

アウトリーチ: 東大駒場キャンパス公開 2018

東京大学先端研システム生物医学研究室群 生命科学講演会「全ライフコースにおける高血圧と糖尿病性腎症に関わるエピジェネティクス機構の解明」丸茂丈史

6. 研究組織 研究分担者 なし

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。