

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05061

研究課題名（和文）慢性腎臓病発症の成因となるエピゲノム変化の解明および新規治療法開発の研究基盤

研究課題名（英文）The effects of epigenetic modification on the pathogenesis and the development of chronic kidney disease

研究代表者

増田 真志（MASUDA, Masashi）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・助教

研究者番号：50754488

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、慢性腎臓病（CKD）で上昇する血中レチノール濃度とFGF23エピゲノム変化の関係を解明することを目指す。CKDモデル動物へのall-transレチノイン酸（ATRA）やRA受容体（RAR）選択的アンタゴニスト投与実験から、ATRAはRARを介して血中FGF23濃度を低下させること示した。ルシフェラーゼアッセイの結果から、RAによるRAR依存的なFGF23遺伝子転写活性低下効果はヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）が関与している可能性が示された。以上から、CKDで増加する血中レチノールはHDACを介して血中FGF23濃度の異常な高値の軽減に寄与している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

わが国の慢性腎臓病（CKD）患者は年々増加傾向で、CKDは新たな「国民病」とも言われている。CKDになると腎臓でのリン調節機構の破綻による高リン血症や異常なFGF23の上昇が、骨病変・血管石灰化等の骨ミネラル代謝異常（CKD-MBD）や筋萎縮・脂肪減少等のタンパク質-エネルギー障害（CKD-PEW）への発展に寄与することが考えられている。本研究成果は、CKD発症・進行だけでなく、CKDに付随して起こる様々な障害の理解につながり、CKDの新規予防・治療法確立にとって大きな一歩となった。また、エピゲノム変化に関しては未だ不明な点が多く、本研究成果がエピゲノム研究発展の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the relationship between the increased plasma retinol levels in chronic kidney disease (CKD) and the epigenetic modification of fibroblast growth factor 23 (FGF23) gene. From the experiment of the administration of all-trans retinoic acid (ATRA) and retinoic acid receptor (RAR)-selective antagonists to CKD model mice, we suggested that ATRA may alleviate elevated plasma FGF23 levels through RAR in CKD. In addition, luciferase assay indicated that histone deacetylase (HDAC) may get involved in the depression effect of RA on the FGF23 gene promoter activity through RAR. Together, these results suggest that retinol may contribute to the alleviation of the abnormal elevation of plasma FGF23 levels in CKD.

研究分野：慢性腎臓病

キーワード：FGF23

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) わが国の慢性腎臓病 (CKD) 患者は年々増加傾向で推定 1,300 万人を超え、CKD は新たな「国民病」とも言われている。CKD 発症の要因の 1 つのリンは生体機能維持に必須の栄養素であり、吸収されたリンは様々な因子による厳密な調節を受けてリン恒常性が保たれる。特に骨から分泌される線維芽細胞増殖因子 (FGF23) は、FGF 受容体 (FGFR) と主に腎臓での発現が高い膜タンパク質 Klotho と複合体 (FGF23/Klotho/FGFR) を形成し腎臓におけるリン排泄制御の中心を担っている。しかし、CKD のように正常な腎機能が損なわれると、腎臓でのリン調節機構の破綻により高リン血症を呈し、骨病変・血管石灰化などの骨ミネラル代謝異常 (CKD-MBD) や筋萎縮・脂肪減少などのタンパク質 - エネルギー障害 (CKD-PEW) へと発展する。つまり、未解明の CKD 発症・進行機序の理解は生命予後の改善にとって非常に重要である。

(2) 近年、CKD モデル動物で血中 transforming growth factor- β (TGF β) 濃度の上昇による血中レチノール (ビタミン A) 濃度の異常な高値が更なる腎機能の低下を助長すると報告された (Hamamura et al. J Biol Chem, 2015)。実際に、我々はレチノイン酸 (活性型ビタミン A) がレチノイン酸受容体 (RAR) /レチノイド X 受容体 (RXR) を介して腎臓のリン再吸収を促進させることを見出しており、レチノイン酸による血中リン濃度の上昇、そして CKD 進行への影響を示唆している (Masuda et al. Biochem J, 2010)。また、エピゲノムとは、「DNA 塩基配列の変化を伴わずに、遺伝子の機能を変化させる仕組み」のことである。近年、エピゲノム変化が様々な疾患の原因となる小胞体ストレスやオートファジーに関与することや (Botti-Millet et al. Am J Physiol Cell Physiol, 2016)、腎損傷による急性腎障害にもエピゲノム変化を介することが報告されている (Marpadga et al. Kidney Int, 2015)。つまり、CKD 発症にもエピゲノム変化が原因となっている可能性が考えられる。しかしながら、レチノイン酸および RAR/RXR によるエピゲノム変化を介した CKD 発症・進行への影響は全く不明である。

2. 研究の目的

本研究は、線維芽細胞増殖因子 (FGF23) /klotho のエピゲノム変化による慢性腎臓病 (CKD) 発症機序を解明し、CKD に対する新規予防・栄養管理法開発のための研究基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) CKD に対するレチノイン酸の影響を検討するために、アデニン食投与により CKD モデルマウスを作製し、all-trans retinoic acid (ATRA: 1 mg/kg 体重) を 10 週間投与する。その後、血液生化学データ、大腿骨重量、大腿骨 FGF23 mRNA 発現量を real-time PCR 法で評価する。

(2) CKD に対する RAR の影響を検討するために、アデニン食投与により CKD モデルマウスを作製し、pan-RAR-ant を 4 週間投与する。その後、血液生化学データ、握力、腓腹筋重量、筋断面積、大腿骨遺伝子発現量を real-time PCR 法で評価する。

(3) human FGF23-2k reporter vector を作製し、その vector と RARs/RXR を細胞にトランスフェクション後、ATRA (100 nM) およびヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 (Trichostatin A: TSA) や DNA メチル化阻害剤 (5-aza-2-deoxycytidine: 5-Aza) 刺激し、luciferase assay で評価する。

(4) CKD に対する RAR γ による影響を検討するために、アデニン食投与により CKD モデルマウスを作製し、RAR γ 選択的アンタゴニスト (RAR γ -ant) を 4 週間投与する。その後、血液生化学データ、大腿骨重量、大腿骨密度、大腿骨遺伝子発現量を real-time PCR 法で評価する。

4. 研究成果

(1) 作製した CKD モデルマウスに ATRA を 10 週間投与した結果、血中 FGF23 濃度には影響は見られず、大腿骨重量、大腿骨 FGF23 mRNA 発現量に関しても特に差はなかった。

(2) 同様に作製した CKD モデルマウスに pan-RAR-ant を 4 週間投与した結果、CKD 群で上昇した血中 FGF23 濃度は pan-RAR-ant 投与により更に上昇し、大腿骨 FGF23 mRNA 発現量は CKD 群よりも pan-RAR-ant 投与により上昇傾向を示した。また、FGF23 発現の抑制因子である dentin matrix protein 1 (DMP1) の大腿骨における mRNA 発現量は、pan-RAR-ant 投与による影響は見られな

った。一方、握力、腓腹筋重量、筋断面積に関しては pan-RAR-ant 投与による影響は見られなかった。

(3) human FGF23 遺伝子プロモーター活性に対して ATRA は抑制的に作用した。それらは RAR/RXR 依存적であり、RAR γ で最も強い効果を示した。さらに、ATRA による human FGF23 遺伝子プロモーター活性の抑制効果は DNA メチル化阻害剤を用いても影響は見られなかったが、HDAC 阻害剤を用いるとそれらの効果が消失した。

(4) 作製した CKD モデルマウスに RAR γ -ant を 4 週間投与した結果、CKD 群で上昇した血中 FGF23 濃度は RAR γ -ant 投与により更に上昇したが、大腿骨 FGF23 mRNA 発現量に対しては RAR γ -ant 投与により影響は見られなかった。しかしながら、CKD 群で低下した大腿骨の海綿骨は RAR γ -ant 投与により更に減少傾向を示した。

以上の結果から、ATRA は FGF23 遺伝子プロモーター活性に対して RARs/RXR 依存적(特に RAR γ) に負の調節作用があり、それには HDAC が関与することが示唆された。また、RAR γ は CKD モデル動物の血中 FGF23 濃度に対しては抑制作用を示すことが示唆されたが、大腿骨 FGF23 mRNA 発現量には影響が見られず血中 FGF23 濃度の変化とは一致しないことから、転写だけでなく翻訳後修飾の影響も考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Masuda Masashi, Yamamoto Hironori, Takei Yuichiro, Nakahashi Otoki, Adachi Yuichiro, Ohnishi Kohta, Ohminami Hirokazu, Yamanaka-Okumura Hisami, Sakae Hiroshi, Miyazaki Makoto, Takeda Eiji, Taketani Yutaka	4. 巻 477
2. 論文標題 All-trans retinoic acid reduces the transcriptional regulation of intestinal sodium-dependent phosphate co-transporter gene (Npt2b)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 817 ~ 831
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20190716	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 該当する

1. 著者名 Yuki Niida, Masashi Masuda, Yuichiro Adachi, Aika Yoshizawa, Hirokazu Ohminami, Yuki Mori, Kohta Ohnishi, Hisami Yamanaka-Okumura, Takayuki Uchida, Takeshi Nikawa, Hironori Yamamoto, Makoto Miyazaki, Yutaka Taketani	4. 巻 67
2. 論文標題 Reduction of stearylCoA desaturase (SCD) contributes muscle atrophy through the excess endoplasmic reticulum stress in chronic kidney disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	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) なし	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 該当する

1. 著者名 Sakai Maiko, Ohnishi Kohta, Masuda Masashi, Ohminami Hirokazu, Yamanaka-Okumura Hisami, Hara Taichi, Taketani Yutaka	4. 巻 84
2. 論文標題 Isorhamnetin, a 3'-methoxylated flavonol, enhances the lysosomal proteolysis in J774.1 murine macrophages in a TFEB-independent manner.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1221 ~ 1231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020.1727309	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 Kawamoto Keisuke, Sakuma Masae, Tanaka Sarasa, Masuda Masashi, Nakao-Muraoka Mari, Niida Yuki, Nakamatsu Yurino, Ito Mikiko, Taketani Yutaka, Arai Hidekazu	4. 巻 72
2. 論文標題 High-fat diets provoke phosphorus absorption from the small intestine in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrition	6. 最初と最後の頁 110694 ~ 110694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nut.2019.110694	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 Tajiri Mari, Nakahashi Otoki, Kagawa Tomohiro, Masuda Masashi, Ohnami Hirokazu, Iwano Masayuki, Takeda Eiji, Taketani Yutaka, Yamamoto Hironori	4. 巻 66
2. 論文標題 Association of increased renal <i>Cyp24a1</i> gene expression with low plasma 1,25-dihydroxyvitamin D levels in rats with streptozotocin-induced diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 49 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.19-79	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 Fukuda-Tatano Shiori, Yamamoto Hironori, Nakahashi Otoki, Yoshikawa Ryouhei, Hayashi Mayu, Kishimoto Maki, Imi Yukiko, Yamanaka-Okumura Hisami, Ohnishi Kohta, Masuda Masashi, Taketani Yutaka	4. 巻 104
2. 論文標題 Regulation of <i>Klotho</i> Expression by Dietary Phosphate During Growth Periods	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Calcified Tissue International	6. 最初と最後の頁 667 ~ 678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00223-019-00525-0	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 Imi Yukiko, Yabiki Norie, Abuduli Maerjianghan, Masuda Masashi, Yamanaka-Okumura Hisami, Taketani Yutaka	4. 巻 63
2. 論文標題 High phosphate diet suppresses lipogenesis in white adipose tissue	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 181 ~ 191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.17-141	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 Yamaguchi Chise, Yamanaka Okumura Hisami, Esumi Haruka, Masuda Masashi, Katayama Takafumi, Taketani Yutaka	4. 巻 65
2. 論文標題 Investigation of dose dependent effects of fat on blood glucose, serum insulin, and appetite sensation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 203 ~ 207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.65.203	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 Miyazaki-Anzai Shinobu, Masuda Masashi, Kohno Shohei, Levi Moshe, Shiozaki Yuji, Keenan Audrey L., Miyazaki Makoto	4. 巻 59
2. 論文標題 Simultaneous inhibition of FXR and TGR5 exacerbates atherosclerotic formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 1709 ~ 1713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1194/jlr.M087239	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 該当する

1. 著者名 Kagawa Tomohiro, Kozai Mina, Masuda Masashi, Harada Nagakatsu, Nakahashi Otoki, Tajiri Mari, Yoshikawa Ryouhei, Nakao Mari, Takei Yuichiro, Iwano Masayuki, Takeda Eiji, Taketani Yutaka, Yamamoto Hironori	4. 巻 500
2. 論文標題 Sterol regulatory element binding protein 1 trans-activates 25-hydroxy vitamin D3 24-hydroxylase gene expression in renal proximal tubular cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 275 ~ 282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.04.058	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 Yoshikawa Ryouhei, Yamamoto Hironori, Nakahashi Otoki, Kagawa Tomohiro, Tajiri Mari, Nakao Mari, Fukuda Shiori, Arai Hidekazu, Masuda Masashi, Iwano Masayuki, Takeda Eiji, Taketani Yutaka	4. 巻 62
2. 論文標題 The age-related changes of dietary phosphate responsiveness in plasma 1,25-dihydroxyvitamin D levels and renal Cyp27b1 and Cyp24a1 gene expression is associated with renal -Klotho gene expression in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 68 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbn.17-20	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 Sugihara Kohei, Masuda Masashi, Nakao Mari, Abuduli Maerjianghan, Imi Yukiko, Oda Naoko, Okahisa Toshiya, Yamamoto Hironori, Takeda Eiji, Taketani Yutaka	4. 巻 61
2. 論文標題 Dietary phosphate exacerbates intestinal inflammation in experimental colitis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 91 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbn.16-117	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14件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Masashi Masuda, Hironori Yamamoto, Adachi Yuichiro, Kohta Ohnishi, Hirokazu Ohnami, Hisami Okumura, Miyazaki Makoto, Eiji Takeda and Yutaka Taketani
2. 発表標題 All-trans retinoic acid reduces intestinal phosphate uptake by the transcriptional regulation of sodium-dependent phosphate co-transporter gene (Npt2b).
3. 学会等名 American Society for Bone and Mineral Research 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新井田 裕樹, 増田 真志, 吉澤 和香, 足立 雄一郎, 大西 康太, 大南 博和, 内田 貴之, 奥村 仙示, 二川 健, 山本 浩範, 竹谷 豊
2. 発表標題 慢性腎臓病による骨格筋の脂肪酸代謝異常を介した脂肪毒性(Lipotoxicity)は筋萎縮(サルコペニア)を惹起する
3. 学会等名 第23回日本病態栄養学会年次集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新井田 裕樹, 増田 真志, 吉澤 和香, 足立 雄一郎, 大西 康太, 大南 博和, 内田 貴之, 奥村 仙示, 二川 健, 山本 浩範, 竹谷 豊
2. 発表標題 慢性腎臓病モデルラットの骨格筋における脂肪酸代謝異常が及ぼす筋萎縮への影響
3. 学会等名 第66回日本栄養改善学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 景子, 増田 真志, 佐々木 皓平, 大南 博和, 大西 康太, 奥村 仙示, 山本 浩範, 竹谷 豊
2. 発表標題 All-trans retinoic acidによるヒストン修飾を介したFGF23発現への影響
3. 学会等名 第7回日本腎栄養代謝研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 景子, 増田 真志, 足立 雄一郎, 大西 康太, 奥村 仙示, 山本 浩範, 竹谷 豊
2. 発表標題 All-trans retinoic acidによるヒストン修飾を介したFGF23発現への影響
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Serina Kabutoya, Masashi Masuda, Yuichiro Adachi, Yilimulati Yimamu, Hisami Yamanaka-Okumura, Hironori Yamamoto, Yutaka Taketani
2. 発表標題 Hypervitaminosis A contributes to abnormal iron metabolism in chronic kidney disease
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 甲谷 芹奈, 増田 真志, イリムラティ イمام, 奥村 仙示, 山本 浩範, 竹谷 豊
2. 発表標題 慢性腎臓病における鉄代謝異常に対するレチノイン酸の影響
3. 学会等名 日本ビタミン学会第70回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新井田 裕樹, 増田 真志, 吉澤 和香, 足立 雄一郎, 内田 貴之, 大西 康太, 河合 慶親, 二川 健, 山本 浩範, 竹谷 豊
2. 発表標題 慢性腎臓病に伴う骨格筋の飽和脂肪酸蓄積はオートファジー不全を介して筋萎縮を誘発する
3. 学会等名 日本ビタミン学会第70回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 甲谷 芹奈, 増田 真志, 新井田 裕樹, 足立 雄一郎, 山田 あかり, 奥村 仙示, 竹谷 豊
2. 発表標題 慢性腎臓病におけるレチノイン酸の腎性貧血に対する影響
3. 学会等名 第50回日本栄養・食糧学会 中国四国支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 新井田裕樹、増田真志、吉澤和香、Ilimulati Yimamu、吉田里沙、甲谷芹奈、奥村仙示、河合慶親、竹谷豊、山本浩範
2. 発表標題 骨格筋脂質代謝異常が慢性腎臓病に伴うProtein Energy Wasting (CKD-PEW) を誘発する
3. 学会等名 第71回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuki Niida, Masashi Masuda, Aika Yoshizawa, Yuichiro Adachi, Yilimulati Yimamu, Serina Kabutoya, Risa Yoshida, Hisami Yamanaka-Okumura, Yoshichika Kawai, Makoto Miyazaki, Hironori Yamamoto, Yutaka Taketani
2. 発表標題 Abnormal lipid metabolism in skeletal muscle mediates chronic kidney disease-induced sarcopenia
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 増田 真志、宮崎 淳
2. 発表標題 慢性腎臓病におけるSCD遺伝子発現変化による血管石灰化発症機序
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 新井田 裕樹, 増田 真志, 足立 雄一郎, イمام イリムラティ, 奥村 仙示, 山本 浩範, 竹谷 豊
2. 発表標題 骨格筋脂質代謝異常が慢性腎臓病に伴う尿毒症性サルコペニア(筋萎縮)を誘発する
3. 学会等名 第64回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 新井田 祐樹, 増田 真志, 吉澤 和香, Yimamu Ilimulati, 吉田 里沙, 甲谷 芹奈, 奥村 仙示, 河合 慶親, 竹谷 豊, 山本 浩範
2. 発表標題 骨格筋脂質代謝異常が慢性腎臓病に伴うProtein Energy Wasting (CKD-PEW) を誘発する
3. 学会等名 第71回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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	竹谷 豊 (TAKETANI Yutaka)		
研究協力者	山本 浩範 (YAMAMOTO Hironori)		
研究協力者	宮崎 淳 (MIYAZAKI Makoto)		