

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19533

研究課題名(和文) ナノキャリアを用いたsiRNAデリバリーによる糖尿病性腎症治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new treatment for diabetic nephropathy by siRNA delivery using nanocarriers

研究代表者

藤田 敏郎 (Toshiro, Fujita)

東京大学・先端科学技術研究センター・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) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性腎症の進行は妨げることが難しいことから、腎構成細胞へのエピジェネティクス修飾がその発症に関与すると考えられていたが、詳細は不明であった。本研究では糖尿病モデルマウスの腎メサンギウム細胞において、線維化や炎症を誘導するTgfb1遺伝子のプロモーターのDNAメチル化が生じており、そのためTgfb1遺伝子発現が亢進して、腎症の進行に関わっていることを示し、糖尿病性腎症進行の新機序を示した。一連の研究により、腎臓の細胞特異的DNAメチル化が、糖尿病性腎症の治療標的としてだけでなく、予知マーカーとして有望であることを提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、糖尿病性腎症の進行には腎構成細胞におけるエピジェネティック修飾が深く関与することを証明した。すなわち糖尿病性腎症の抑制のためには、エピジェネティック治療薬の開発と共に、有用な早期マーカーの探索とそれによる予防が重要であることを実証したものであり、糖尿病による腎機能障害の医療に貢献するものと期待される

研究成果の概要(英文)：Because the progression of diabetic nephropathy is difficult to interfere with, it was thought that epigenetic modifications to renal constituent cells were involved in its development, but the details were unclear. In this study, we show that DNA methylation of the promoter of the Tgfb1 gene, which induces fibrosis and inflammation, occurs in renal mesangium cells of diabetic mouse models, and that the increased expression of the Tgfb1 gene is involved in the progression of nephropathy, indicating a new mechanism of diabetic nephropathy progression. A series of studies showed that cell-specific DNA methylation of the kidney is a promising predictive marker as well as a therapeutic target for diabetic nephropathy.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：糖尿病性腎症 エピジェネティクス DNAメチル化

## 1. 研究開始当初の背景

現在、腎不全患者の透析導入による医療費増大が大きな社会問題となっている。腎不全の原因疾患の中で糖尿病性腎症が一番の原因疾患であり、その数は32万人を越え、糖尿病性腎症の進行抑制は早急に解決すべき課題と考えられる。大規模臨床試験により、糖尿病の初期の血糖コントロールが悪いと記憶に残り(メタボリックメモリー)、後年になっても腎症が早く進行することが示された。糖尿病性腎症は、一度発症すると、その後血糖値を正常化しても、進行をくい止めるのが困難である事を指しており、その背景にはエピジェネティック異常の存在があると考えられた。また、エピジェネティック異常の中でもDNAのメチル化修飾は、一度修飾を受けると安定して固定化されるため、病態により大きな影響を与えられた。

## 2. 研究の目的

本研究により、まず糸球体メサンギウム細胞でのエピジェネティック異常が、糖尿病性腎症の進行に関わるかどうか検討することとした。つぎに見出したエピジェネティック異常を標的としてsiRNAなどを用いて糖尿病性腎症の進行を抑制できるか検討を加える。糸球体へのsiRNAデリバリーにはナノキャリアを用いて、腎臓への核酸医薬の選択的治療にむけた開発を試みる。最後に、動物モデルと同様のエピジェネティック異常が人でも生じているかどうか、糖尿病性腎症生検サンプルを用いてDNAメチル化異常の検討を行う。

## 3. 研究の方法

DNAメチル化は細胞系列ごとに異なるため、マウスの糸球体をsievingで収集した後、既報の方法にしたがって初代培養してメサンギウム細胞を抽出し、メチル化解析を行った。ビーズを用いたより精密な糸球体単離法も同時に施行する。コントロールdb/+マウスと糖尿病モデルdb/dbマウスで遺伝子発現を比較し、既報の遺伝子データベースを踏まえて、エピジェネティック異常の候補遺伝子を抽出して、DNAメチル化の変化を解析し異常を同定する。DNAメチル化の異常が生じた遺伝子などを標的に、糸球体にsiRNAを導入し、治療が可能かどうか検討を進める。これまでに正常マウスに対して5nmol siRNAを含有するpolyion complex (PIC) ナノキャリアを腹腔内投与するとメサンギウム細胞選択的に導入できることを報告した(J Am Soc Nephrol 2010)が、糖尿病マウスについては未知である。PICナノキャリアなどを用いてsiRNAを糸球体に導入する最適の投与条件を決定する。そのうえで、DNAメチル化異常を呈する遺伝子を標的としたsiRNAを投与し、尿中アルブミン量、メサンギウム領域などの病理学的検討および糸球体の線維化・炎症関連遺伝子発現の定量を行い、有効な治療法を見出す。丸茂はDNAメチル化解析を行う。ヒトへの応用に向けて、糖尿病性腎症患者の糸球体でのDNAメチル化異常を同定する。腎がんのため摘出した腎臓の健常部分を対象として腎症は生検組織用レーザーマイクロダイセクションで腎臓構成成分ごとにサンプルを採取する。動物モデルで得られた遺伝子を中心に解析を進めて、異常メチル化変化を同定する。

## 4. 研究成果

db/dbマウス由来のメサンギウム細胞を用いて、線維化に関連する遺伝子のDNAメチル化状態を調べたところ、成長因子の遺伝子、炎症関連遺伝子、angiotensin II受容体遺伝子にDNA脱メチル化異常が誘導されていることが分かった。これまでの報告から成長因子のTGF- $\beta$ の活性化が糸球体硬化に重要であることが示唆されていたため、Tgfb1遺伝子のDNA脱メチル化の機序に焦点を絞って研究を進めた。その結果、Tgfb1遺伝子promoter領域の転写因子Usf-1の結合部位への、DNAメチル化酵素DNMT1の結合が減弱することで、DNAメチル化が減少し、Tgfb1の発現亢進が誘導されていることが明らかとなった。さらにDNAメチル化修飾を誘導する葉酸を投与する実験により、DNA脱メチル化異常が発現亢進の原因であることを証明した。また、血糖を正常化しても良くならなかったDNAメチル化異常と腎機能障害が抗酸化薬TEMPOLの投与にて改善したことから、DNAのメチル化異常には酸化ストレスの亢進が重要な役割を演じていることを突き止めた。以上の内容は論文として発表した(Oba S, et al *Sci Rep* 2018)。

db/dbマウスに対してPICナノキャリアを腹腔内投与しメサンギウム細胞選択的にsiRNAを導入できるか検討を加えたが、siRNAの導入効率が当初考えていたほど高くないことがわかってきた。原因の一つにdb/dbマウスの糸球体病変が軽度でありナノキャリアを取り込みにくい環境にあることが挙げられた。そこで、db/dbマウスに侵襲を加えて糸球体の炎症がより強く尿アルブミン量が5-10倍となるモデルを作成し、標的となる糸球体遺伝子発現の解析を行った。その結果、進行型のdb/dbマウスの糸球体では、コントロールに比べて、炎症性因子を中心に遺伝子発現の異常が認められた。なかでもミネラルコルチコイド受容体関連の経路に異常活性化が認められた。この結果から、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬フィネレノン投与したところ、糸球体病変、蛋白尿ともに著明に改善することが明らかになった(ASN Kidney Week 2019で発表、論文準備中)。ミネラルコルチコイド受容体関連の経路のなかで、新たな糸球体の治療標的となる因子も認められ、阻害薬により症状が改善することを見出し(論文準備中) siRNAによる阻害をふくめ検討を進めている。

また、ヒト糖尿病性腎症患者のDNAメチル化異常の同定にむけ、組織収集を進めた。その結果、糖尿病性腎症の腎臓では正常に比べてDNAメチル化異常を呈する遺伝子を複数同定

した。さらに、糖尿病患者の尿中で、腎機能悪化に関連する DNA メチル化値を見出した (ASN Kidney Week 2019 で発表、論文投稿中)。これらの DNA メチル化変化および変化の見られる遺伝子が治療標的となるか、siRNA を用いた検証実験を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Oba Shigeyoshi, Ayuzawa Nobuhiro, Nishimoto Mitsuhiro, Kawarazaki Wakako, Ueda Kohei, Hirohama Daigoro, Kawakami-Mori Fumiko, Shimosawa Tatsuo, Marumo Takeshi, Fujita Toshiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Aberrant DNA methylation of Tgfb1 in diabetic kidney mesangial cells	5. 発行年 2018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/s41598-018-34612-3	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 Kawakami-Mori Fumiko, Nishimoto Mitsuhiro, Rehemani Latapati, Kawarazaki Wakako, Ayuzawa Nobuhiro, Ueda Kohei, Hirohama Daigoro, Kohno Daisuke, Oba Shigeyoshi, Shimosawa Tatsuo, Marumo Takeshi, Fujita Toshiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Aberrant DNA methylation of hypothalamic angiotensin receptor in prenatal programmed hypertension	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JCI Insight	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） 10.1172/jci.insight.95625	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 Kawarazaki W, Mizuno R, Nishimoto M, Ayuzawa N, Hirohama D, Ueda K, Kawakami-Mori F, Oba S, Marumo T and Fujita T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Salt causes aging-associated hypertension via vascular Wnt5a under Klotho deficiency	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin invest	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） -	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 Ayuzawa N, Nishimoto M, Ueda K, Hirohama D, Kawarazaki W, Shimosawa T, Marumo T, Fujita T.	4. 巻 31
2. 論文標題 Two Mineralocorticoid Receptor-Mediated Mechanisms of Pendrin Activation in Distal Nephrons.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Am Soc Nephrol	6. 最初と最後の頁 748-764
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1681/ASN.2019080804	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 Hirohama D, Fujita T.	4. 巻 42
2. 論文標題 Evaluation of the pathophysiological mechanisms of salt-sensitive hypertension.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hypertens Res	6. 最初と最後の頁 1848-1857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-019-0332-5	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 Nishimoto M, Ohtsu H, Marumo T, Kawarazaki W, Ayuzawa N, Ueda K, Hirohama D, Kawakami-Mori F, Shibata S, Nagase M, Isshiki M, Oba S, Shimosawa T, Fujita T.	4. 巻 42
2. 論文標題 Mineralocorticoid receptor blockade suppresses dietary salt-induced ACEI/ARB-resistant albuminuria in non-diabetic hypertension: a sub-analysis of evaluate study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hypertens Res	6. 最初と最後の頁 514-521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-018-0201-7	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 丸茂丈史	4. 巻 25
2. 論文標題 生活習慣病の未病にかかわるエピゲノム情報	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本未病システム学会雑誌	6. 最初と最後の頁 71-74
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 無
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 丸茂丈史	4. 巻 272
2. 論文標題 腎臓病の進展に関わるエピジェネティクス	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 75-79
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 無
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 丸茂丈史	4. 巻 10
2. 論文標題 代謝疾患とエピゲノム	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 遺伝子医学	6. 最初と最後の頁 49-52
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 無
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 -

〔学会発表〕 計22件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 丸茂丈史
2. 発表標題 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？
3. 学会等名 第25回日本未病システム学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田敏郎、丸茂丈史
2. 発表標題 エピゲノム情報に基づく新しい腎臓病治療
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nobuhiro Ayuzawa, Mitsuhiro Nishimoto, Daigoro Hirohama, Kohei Ueda, Wakako Kawarazaki, Tastuo Shimosawa, Takeshi Marumo, Toshio Fujita
2. 発表標題 RAAS-driven pendrin regulation to maintain fluid homeostasis
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河原崎和歌子、水野理介、西本光宏、鮎澤信宏、広浜大五郎、上田浩平、丸茂丈史、藤田敏郎
2. 発表標題 加齢に伴う食塩感受性高血圧発症機序の検討
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 広浜 大五郎、鮎澤 信宏、上田 浩平、西本 光宏、河原崎 和歌子、下澤 達雄、丸茂 丈史、柴田 茂、藤田 敏郎
2. 発表標題 Pendrinの血圧・水電解質代謝調節作用に関する検討
3. 学会等名 第22回日本心血管内分泌代謝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 広浜 大五郎、鮎澤 信宏、西本 光宏、河原崎 和歌子、下澤 達雄、丸茂 丈史、柴田 茂、藤田 敏郎
2. 発表標題 Pendrinの血圧・電解質代謝調節作用に関する役割
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 河原崎和歌子、水野理介、西本光宏、鮎澤信宏、広浜大五郎、森典子、大庭成喜、丸茂丈史、藤田敏郎
2. 発表標題 加齢に伴う食塩感受性高血圧発症におけるKlotho-Wnt-Rho pathwayの関与
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 Nobuhiro Ayuzawa, Mitsuhiro Nishimoto, Daigoro Hirohama, Wakako Kawarazaki, Takeshi Marumo, Toshiro Fujita
2. 発表標題 Two distinct regulations of pendrin by mineralocorticoid receptor in distal nephron
3. 学会等名 The 44th International Aldosterone Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田敏郎
2. 発表標題 食塩と高血圧研究の進歩～エピジェネティクス～
3. 学会等名 第41回日本高血圧学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Marumo
2. 発表標題 Epigenetic mechanisms involved in chronic kidney disease and the anticipated clinical applications.
3. 学会等名 LSBM Symposium (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiro Fujita
2. 発表標題 Homer Smith Award Lecture, 'Salt, Hypertension and the Kidneys'
3. 学会等名 American Society of Nephrology, Kidney Week 2019, Washington, DC. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Marumo, Daigoro Hirohama, Mitsuhiro Nishimoto, Nobuhiro Ayuzawa, Wakako Kawarazaki, Shigeyoshi Oba, Toshiro Fujita.
2. 発表標題 "Urinary kidney-specific DNA methylation signature correlates with renal function decline in diabetes"
3. 学会等名 American Society of Nephrology, Kidney Week 2019, Washington, DC. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daigoro Hirohama, Mitsuhiro Nishimoto, Nobuhiro Ayuzawa, Wakako Kawarazaki, Shigeyoshi Oba, Takeshi Marumo, Toshiro Fujita.
2. 発表標題 "The mineralocorticoid receptor antagonist Finerenone limits podocyte injury in high-salt loaded db/db mice"
3. 学会等名 American Society of Nephrology, Kidney Week 2019, Washington, DC. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsuhiro Nishimoto, Hiroshi Ohtsu, Takeshi Marumo, Wakako Kawarazaki, Nobuhiro Ayuzawa, Daigoro Hirohama, Toshiro Fujita.
2. 発表標題 Importance of dietary salt intake for the efficacy of mineralocorticoid receptor blockade against ACEI/ARB-resistant albuminuria: a sub-analysis of EVALUATE study.
3. 学会等名 International Symposium of Aldosterone and Related Substances in Hypertension 2019, Sendai (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nobuhiro Ayuzawa, Mitsuhiro Nishimoto, Daigoro Hirohama, Wakako Kawarazaki, Takeshi Marumo, Toshiro Fujita.
2. 発表標題 Two different mechanism of pendrin regulation by mineralocorticoid receptor in distal nephron.
3. 学会等名 International Symposium of Aldosterone and Related Substances in Hypertension 2019, Sendai (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河原崎和歌子, 水野理介, 西本光宏, 鮎澤信宏, 広浜大五郎, 森典子, 大庭成喜, 丸茂丈史, 藤田敏郎.
2. 発表標題 「老化に伴う食塩感受性高血圧発症機序の解明」
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鮎澤 信宏、広浜 大五郎、西本 光宏、河原崎 和歌子、丸茂 丈史、藤田 敏郎.
2. 発表標題 「ミネラルコルチコイド過剰による食塩感受性高血圧におけるPendrin活性化機構」
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河原崎和歌子, 水野理介, 西本光宏, 鮎澤信宏, 広浜大五郎, 大庭成喜, 丸茂丈史, 藤田敏郎.
2. 発表標題 「加齢に伴う食塩感受性高血圧発症機序の解明」
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸茂丈史、星野純一、河原崎和歌子、西本光宏、鮎澤信宏、広浜大五郎、佐藤敦久、乳原善文、下澤達雄、藤田敏郎.
2. 発表標題 「エピジェネティック尿検査による糖尿病性腎症悪化の診断」
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河原崎和歌子、水野理介、西本光宏、鮎澤信宏、広浜大五郎、大庭成喜、丸茂丈史、藤田敏郎.
2. 発表標題 「加齢に伴う食塩感受性高血圧発症機序の解明」
3. 学会等名 第29回日本循環薬理学会・第55回高血圧関連疾患モデル学会合同学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸茂丈史
2. 発表標題 慢性腎臓病に関わるエピジェネティクスと臨床応用への展望
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019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
研究分担者	丸茂 丈史  (Marumo Takeshi)  (70265817)	東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授   (12601)	