

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390213

研究課題名(和文) エピジェネティックな低酸素応答の解析による腎臓病の病態生理の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of kidney disease via epigenetic responses against hypoxia

研究代表者

南学 正臣 (Nangaku, Masaomi)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：90311620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：in vivo における腎臓でのエピジェネティックな変化の機能的意義を明らかにするため、臓器レベルでの ChIP-seq を行うための条件検討を行った。laser capture microdissection による PAT-ChIP を検討したが、RNA の quality が ChIP に耐える十分良質な状態の採取ができず、最終的に臓器レベルで whole の ChIP を行い、腎臓の大半を占める尿細管を対象とすることにした。モデル動物としては、虚血再還流後急性腎障害の後で長期的に進展する腎線維化モデルを使用し、ヒストン修飾を調節する化合物を用いて線維化の状態に変化が起ることを見出した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate a pathogenic role of epigenetic changes in the kidney in vivo, we tried to optimize experimental conditions to perform ChIP-seq of organs. We attempted to perform PAT-ChIP utilizing laser capture microdissection. However, we could not obtain RNA with the quality high enough for ChIP analysis. We finally decided to perform ChIP of the whole kidney with expectation that the results should reflect change of the tubules, which comprise most of the kidney. We employed a kidney fibrosis model that develops long after transient acute kidney injury by ischemia/reperfusion. We found that fibrotic conditions alter by treatment of compounds that regulate histone modifications.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：低酸素 HIF エピジェネティクス エピゲノム ヒストン修飾 慢性腎臓病 腎細胞癌

### 1. 研究開始当初の背景

腎臓病の進行には、尿細管間質の低酸素状態が深く関与しており、これまで低酸素誘導転写因子 hypoxia-inducible factor (HIF) による遺伝子発現の転写調節について活発な研究が行われてきた。しかしながら、HIF の活性化は基本的には慢性的な障害に対して保護的に働くにも関わらず、条件によっては障害を促進させる場合があり、その詳細な作用機序を新しい切り口で解析することが喫緊の課題であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、低酸素による慢性腎臓病 CKD 進行機転に関する研究を、従来のゲノムの観点から、長期的な影響を制御するエピゲノムに新展開させ、次世代高速シーケンサーを用いて低酸素応答に伴うヒストン修飾の変化を網羅的かつ定量的に解析することを目的とした。これにより腎臓における低酸素によるエピゲノミックな転写制御の詳細の理解を深め、HIF 活性化による context dependent な効果を読み解くことが可能になり、CKD 進行と腎臓の線維化の病態解明および新規治療ターゲットの同定に新天地を開くことを目指した。

### 3. 研究の方法

腎臓の低酸素進行において、障害の進行の主座となる尿細管細胞と、酸素分圧の変化を直接受ける血管内皮細胞の解析を、培養細胞を用いて行う。これまで抗体などに関する使用経験の蓄積があるヒト血管内皮細胞 (HUVEC) を用い、通常酸素分圧と低酸素条件で細胞を培養し、マイクロアレイにより遺伝子の発現変動を、特にヒストン修飾蛋白に注目して経時的に解析する。ヒストン修飾については、代表的な active mark である H3K4me3、enhancer mark である H3K4me1、active enhancer mark である H3K27ac、suppressive mark である H3K9me2、H3K9me3、silent mark である H3K27me3 を調べる。

次に、クロマチン免疫沈降により濃縮した DNA 断片を用い、Illumina Genome Analyzer システムを用いて ChIP-seq をすることによりゲノムワイドな解析を行う。これにより、HIF の結合とヒストン修飾の解析を定量的に高感度かつ精密に行うことができる。特に細胞保護および線維化に関与する分子の HIF 結合領域の周辺の変化に注目し、遺伝子発現調節に重要と思われる低酸素誘導性のヒストン修飾を同定する。対象とする分子の絞込みには、これまで我々の蓄積してきた慢性低酸素状態の腎臓の transcriptome、proteome、siRNA library screening などのデータベースと比較することにより、特に機能的に重要性が高いと

思われる候補を絞り込んで解析を進める。機能的に重要と思われる低酸素誘導性のヒストン修飾蛋白を同定した後に、そのヒストン調節蛋白の機能的意義を明らかにする。

並行して、実験動物の腎臓におけるヒストン修飾蛋白の発現変動を解析する。laser-capture microdissection を利用した paraffin-embedded pathology ChIP (PAT-ChIP) を行い、通常の PAT-ChIP のデータと比較する。更に、線維化の進行について、エピゲノムの観点からの解析を行う。

### 4. 研究成果

培養血管内皮細胞を低酸素で刺激し、ヒストン修飾蛋白の発現変動を解析し、その変動に相当するヒストン修飾の変化を ChIP-seq でゲノムワイドに解析し、種々の分子の hypoxia inducible factor (HIF) 結合領域周辺の変化に注目して解析を進めた。なかでも低酸素状態で嫌氣的解糖を助ける glucose transporter 3 (SLC2A3) においては、低酸素に伴って HIF 依存性に発現が上昇する KDM3A により抑制性ヒストン修飾の脱メチル化が起こり、更にクロモゾームの高次構造の変化が起こることにより、低酸素での発現上昇が起こることが分かった。

また、低酸素状態の腎臓で最もシグナル・ノイズ比よく発現が増加する angiopoietin like 4 (ANGPTL4) のエピゲノミックな発現調節と、それとともなうクロマチン高次構造の変化を解明した。

更に、この研究の過程で低酸素状態で HIF が結合する分子のうち新規 HIF ターゲット分子として sperm-associated antigen 4 (SPAG4) を同定した。癌細胞の生存には低酸素に対する抵抗性が重要であることが知られているが、SPAG4 は通常の腎臓ではあまり発現がみられないが腎細胞癌では高発現し、SPAG4 の高発現は腎細胞癌の予後と相関し、更に SPAG4 は細胞質分裂の時に intercellular bridge に局在して分裂を調節する役割を果たしていることを示した。

一方、抗癌剤として使用される anthracycline 系の薬剤は HIF の抑制作用があり、これが抗癌剤としての効果の一端をになっているものの、その副作用としての心不全の発症にも寄与していることを示した。

慢性腎臓病では低酸素が末期腎不全への final common pathway となっている。本来そのような腎臓では、HIF が低酸素に対する防御機構として発動するべきであるが、尿毒素によって HIF と co-factor である p300 との結合が阻害され、尿毒症状態ではヒストンのアセチル化が減弱することにより十分な生体防御作用を発揮できないことを示した。この尿毒症状態での HIF

target 分子のヒストンアセチル化減弱は、腎性貧血の主因である EPO 産生低下に關与している可能性があるが、同時に腎臓病で起こる小胞体ストレスが抑制性転写調節因子 ATF4 を介して EPO 発現を抑制し、腎性貧血の増悪に關与することも判明した。

laser capture microdissection による PAT-ChIP の検討では、RNA の quality が ChIP に耐える十分良質な状態の採取ができず、最終的に臓器レベルで whole の ChIP を行い、腎臓の大半を占める尿細管を対象とすることにした。モデル動物としては、虚血再還流後急性腎障害の後で長期的に進展する腎線維化モデルを使用し、ヒストン修飾を調節する化合物を用いて線維化の状態に変化が起ることを見出した。

#### 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 13 件)

Mimura I, Nangaku M, Kanki Y, Tsutsumi S, Inoue T, Kohro T, Yamamoto S, Fujita T, Shimamura T, Suehiro J, Taguchi A, Kobayashi M, Tanimura K, Inagaki T, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Aburatani H, Kodama T, Wada Y. Dynamic change of chromatin conformation in response to hypoxia enhances the expression of GLUT3 (SLC2A3) by cooperative interaction of hypoxia-inducible factor 1 and KDM3A. *Mol Cell Biol*. 2012 Aug;32(15):3018-32

Tanaka T, Yamaguchi J, Shoji K, Nangaku M. Anthracycline inhibits recruitment of hypoxia-inducible transcription factors and suppresses tumor cell migration and cardiac angiogenic response in the host. *J Biol Chem*. 2012 Oct 12;287(42):34866-82

Shoji K, Murayama T, Mimura I, Wada T, Kume H, Goto A, Ohse T, Tanaka T, Inagi R, van der Hoorn FA, Manabe I, Homma Y, Fukayama M, Sakurai T, Hasegawa T, Aburatani H, Kodama T, Nangaku M. Sperm-associated antigen 4, a novel hypoxia-inducible factor 1 target, regulates cytokinesis, and its expression correlates with the prognosis of renal cell carcinoma. *Am J Pathol*. 2013 Jun;182(6):2191-203

Nangaku M, Rosenberger C, Heyman SN, Eckardt KU. Regulation of hypoxia-inducible factor in kidney disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013 Feb;40(2):148-57

Tanaka T, Nangaku M. Angiogenesis and hypoxia in the kidney. *Nat Rev Nephrol*. 2013 Apr;9(4):211-22

Mimura I, Tanaka T, Nangaku M. Novel therapeutic strategy with hypoxia-inducible factors via reversible epigenetic regulation mechanisms in progressive tubulointerstitial fibrosis. *Semin Nephrol*. 2013 Jul;33(4):375-82

Chiang CK, Nangaku M, Tanaka T, Iwawaki T, Inagi R. Endoplasmic reticulum stress signal impairs erythropoietin production: a role for ATF4. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013 Feb 15;304(4):C342-53

Tanaka T, Yamaguchi J, Higashijima Y, Nangaku M. Indoxyl sulfate signals for rapid mRNA stabilization of Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 2 (CITED2) and suppresses the expression of hypoxia-inducible genes in experimental CKD and uremia. *FASEB J*. 2013 Oct;27(10):4059-75

Mimura I, Kanki Y, Kodama T, Nangaku M. Revolution of nephrology research by deep sequencing: ChIP-seq and RNA-seq. *Kidney Int*. 2014 Jan;85(1):31-8

Shoji K, Tanaka T, Nangaku M. Role of hypoxia in progressive chronic kidney disease and implications for therapy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014 Mar;23(2):161-8

Inoue T, Kohro T, Tanaka T, Kanki Y, Li G, Poh HM, Mimura I, Kobayashi M, Taguchi A, Maejima T, Suehiro J, Sugiyama A, Kaneki K, Aruga H, Dong S, Stevens JF, Yamamoto S, Tsutsumi S, Fujita T, Ruan X, Aburatani H, Nangaku M, Ruan Y, Kodama T, Wada Y. Cross-enhancement of ANGPTL4 transcription by HIF1 alpha and PPAR beta/delta is the result of the conformational proximity of two response elements. *Genome Biol*. 2014 Apr 10;15(4):R63

Jo-Watanabe A, Ohse T, Nishimatsu H, Takahashi M, Ikeda Y, Wada T, Shirakawa J, Nagai R, Miyata T, Nagano T, Hirata Y, Inagi R, Nangaku M. Glyoxalase I reduces glycative and oxidative stress and prevents age-related endothelial dysfunction through modulation of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Aging Cell*.

2014 Jun;13(3):519-28

Tanaka S, Tanaka T, Nangaku M. Hypoxia as a key player in the AKI-to-CKD transition. Am J Physiol Renal Physiol. 2014 Dec 1;307(11):F1187-95

〔学会発表〕(計30件)

Nangaku M. Epigenetic modulation of renal ischemic response. (招待講演). ISN Forefront Systems Biology and the Kidney. 2012 6/7-10 Michigan, USA

Nangaku M. Uremia and hypoxic organ damage: a long-term consequence. (招待講演) 30th International Society of Blood Purification. 2012 9/7 Yokohama, Japan

南学正臣. 生活習慣病と癌における低酸素とHIFの役割の解明. (招待講演) 第35回日本分子生物学会年会 2013 12/12 福岡

Nangaku M. Breathless: Dynamic Changes in Chromatin Conformation in Renal Hypoxia. (招待講演) The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Nephrology. 2013 10/7 Atlanta, USA

など

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

南学 正臣 (NANGAKU, Masaomi)  
東京大学医学部附属病院・教授  
研究者番号: 90311620

### (2) 研究分担者

稲城 玲子 (INAGI, Reiko)  
東京大学医学部附属病院・特任准教授  
研究者番号: 50232509

和田 健彦 (WADA, Takehiko)  
東京大学医学部附属病院・講師  
研究者番号: 90447409

田中 哲洋 (TANAKA, Tetsuhiro)

東京大学医学部附属病院・病院講師  
研究者番号: 90508079

大瀬 貴元 (OHSE, Takamoto)  
東京大学医学部附属病院・その他  
研究者番号: 10568447

### (3) 連携研究者

児玉 龍彦 (KODAMA, Tatsuhiko)  
東京大学先端科学技術センター・教授  
研究者番号: 90170266

油谷 浩幸 (ABURATANI, Hiroyuki)  
東京大学先端科学技術センター・教授  
研究者番号: 10202657