

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461230

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症の新規治療法開発に向けたエピジェネティック異常の解明

研究課題名(英文) Exploration of epigenetic abnormality of diabetic kidney disease for novel therapy

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：透析導入原疾患の第一位を占める糖尿病性腎症は大きな医学的・社会的負担となっている。進行性の病態は、細胞の形質変化を持続させるエピジェネティック異常が原因となって生じることが明らかになってきた。

本研究によって、糖尿病が腎臓にDNAメチル化異常を生じさせるか調べた。糖尿病マウスの腎臓近位尿細管では腎障害の進行に関連のあるアンジオテンシノーゲンやHGF受容体などの遺伝子にDNAメチル化異常が生じて、障害因子の上昇と保護因子の減少の維持に関わると思われた。見出されたエピジェネティック異常の予防とリバースさらに異常を呈する遺伝子、異常の上流下流各段階に対する治療が腎症進行に対して有効であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Diabetic kidney disease is the leading cause of end stage renal disease in Japan. Recent evidence indicates that abnormalities in epigenetics play a causative role in the development of chronic diseases. Epigenetics is a switching mechanism involved in regulation of gene expression by DNA methylation and histone modifications. In the present study, we investigated whether diabetes induces aberrant DNA methylation in the kidney.

We found that abnormalities in DNA methylation underlie persistent expression of genes involved in diabetic kidney disease, such as angiotensinogen and HGF receptor in diabetic mice. Because aberrant DNA methylation was resistant to glyceamic therapy, epigenetic abnormalities are likely to maintain persistent expression of genes involved in injury and/or decrease in protective factors. Therapy against abnormal epigenetic modifications may be beneficial for the development of diabetic kidney disease.

研究分野：腎臓内科

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

(1) 糖尿病性腎症回復の可能性

糖尿病性腎症は透析導入原疾患の第一位を占めるとともに、独立した心血管病のリスク因子である。糖尿病性腎症は早期であれば回復しうること(N Engl J Med 348,2285,2003)や進行していても臓器移植によって改善すること(N Engl J Med 339,69,1998)が報告されているが一般には腎障害が進行してしまう例が多い。進行性の病態が形成されるしくみの解明は、糖尿病性腎症を予防・回復させる画期的な治療法の開発につながる事が期待される。

(2) エピジェネティック異常は進行性病態の治療標的になる

エピジェネティック機構はDNAメチル化やヒストン修飾などによって遺伝子発現を調節するしくみである。癌や慢性疾患ではエピジェネティック状態に異常が生じて細胞の形質変化をきたす。生じたエピジェネティック異常は細胞分裂のときにも複製されるため細胞の記憶に残り、進行性の病態の原因となることが明らかになった。癌抑制遺伝子に生じるDNAメチル化異常は新たな癌治療標的として注目され、DNAメチル化異常を是正する薬剤の臨床応用が始まっている。糖尿病でも高血糖が血管内皮のヒストンメチル化異常を引き起こし、血管炎症の持続の原因になることが示された(J Exp Med 205,2409,2008)。一方、糖尿病性腎症進行に関わるエピジェネティック異常は明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

(1) 糖尿病性腎症モデルでのエピジェネティック異常の解明

エピジェネティック異常のなかでもDNAメチル化の異常は、一度生じると回復しにくいことが知られており、不可逆的病態の原因になりうる。しかし、糖尿病による腎臓DNAメチル化変化は知られていなかった。本研究では糖尿病モデル動物の腎臓に生じるDNAメチル化異常を解明することを目的とした。DNAメチル化プロファイルは組織間や組織構成細胞毎に全く異なるため、糸球体分画、近位尿細管細胞を分取し、分画ごとに糖尿病で生じるDNAメチル化異常を解析した。

(2) エピジェネティック異常の成立機序の解明

DNAメチル化とヒストン修飾は互いに影響を及ぼすことが知られている。DNAメチル化異常の成立に、どのようなヒストン修飾異常が影響を及ぼしているか経時的に検討を加えた。さらに、高血糖の治療によってエピゲノム異常が可逆的に治療可能かどうか検討を加えた。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病 db/db マウス、近位尿細管でのDNA

メチル化異常の解析

尿細管の障害が糖尿病性腎症の予後決定に重要な要因となることが近年明らかにされてきている。10週令雄性 db/+マウスからソーターにより近位尿細管分画を分取してコントロールとして用いた。まずはD-REAM法を用いて(Genome Res 18,1969,2008 Yagi et al)正常近位尿細管細胞のメチル化状態を把握したのちに糖尿病を呈する db/db マウスと比較して病的なDNAメチル化変化を解明した。

(2) ヒストン修飾異常の解析

異常メチル化がみられた遺伝子についてヒストン修飾 H3K9 アセチル化、H4K4 トリメチル化をChIPにより解析した。また、エピゲノム変化を db/db マウスの代謝変化に合わせて経時的に解析し、遺伝子発現変化がどのように固定化し腎症が不可逆的障害に至るか検討を加えた。

(3) 抗糖尿病薬の効果

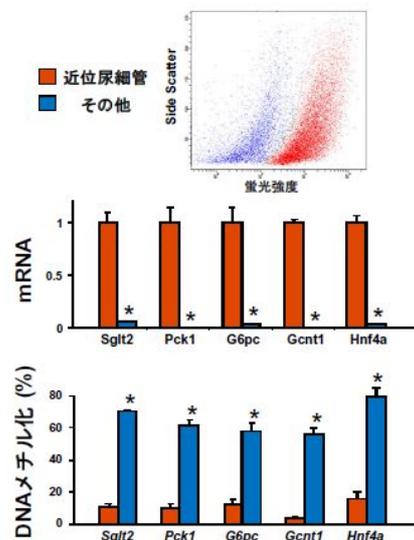
糖尿病マウスで認められたエピジェネティック異常が治療に抵抗性を示して、症状の固定化に関わるか調べるため、抗糖尿病薬ピオグリタゾン を 5-8 週令の間 db/db マウスに投与して反応を調べた。

4. 研究成果

(1) 近位尿細管細胞に特異的なDNAメチル化の解明

DNAメチル化は臓器ごとに固有であり、腎臓内でも細胞種によって異なることが予想された。糖尿病性腎症では蛋白尿を伴わずに腎機能が悪化する尿細管間質障害が主体となる群があることが明らかになってきた。そこで本研究では尿細管に焦点をあて、近位尿細管をソーターで分取しDNAメチル化を解析した。まず正常マウスのDNAメチル化解析の結果、糖輸送体 Sglt2、糖新生酵素 Pck1、G6pcなどが正常近位尿細管では腎臓内で特異的に脱メチル化していることがわかった。

腎臓内でも臓器の間と同様に、重要な機能を担う遺伝子はエピゲノムレベルで発現が調節されていると思われる(右図)。



(2) 糖尿病マウスでの腎臓 DNA メチル化異常
 正常マウスの所見をもとにして糖尿病マウス db/db の近位尿細管と比較したところ、糖尿病によりアンジオテンシノーゲンや HGF 受容体などの遺伝子に DNA メチル化異常が生じている事がわかった(下表)。

糖尿病による近位尿細管メチル化異常

gene	メチル化変化 糖尿病/正常(%)	mRNA変化 糖尿病/正常	遺伝子名	機能
<i>Abcc4</i>	-17	2.22	ATP-binding cassette, sub-family C member 4	細胞内cAMPを調節
<i>Agt</i>	-10	3.65	angiotensinogen	血圧・腎障害に与与の可能性
<i>Met</i>	-10	0.34	met proto-oncogene	HGF受容体 HGF/met系:腎症に保護的
<i>Slc2a5</i>	-5	1.93	solute carrier family 2 member 5 (glut5)	果糖の再吸収
<i>Cldn18</i>	+27	nd	claudin 18	上皮間接着
<i>Kif20b</i>	+13	0.70	kinesin family member 20B	細胞分裂
<i>Sico1a1</i>	+11.3	0.11	solute carrier organic anion transporter family member 1a1	有機イオン輸送 薬物、胆汁酸

糖尿病による代謝異常の進行度合いに合わせてエピゲノム異常を解析したところ、血糖の上昇に伴いまずヒストンアセチル化が変化し、その後、ヒストンメチル化、DNA メチル化へとエピゲノム異常が波及しており、エピゲノム異常は経時的に重層化することがわかった。また、エピゲノムを変化させると遺伝子発現が変わるか培養尿細管細胞にヒストン脱アセチル化阻害薬や DNA メチル化阻害薬を添加して調べた。その結果、アンジオテンシノーゲンの遺伝子はこれらのエピゲノム作用薬で発現が上昇することが観察された。この結果から、エピゲノム異常が、遺伝子発現異常の原因になっていると考えられた。

糖尿病マウス db/db の腎臓に生じた DNA メチル化とヒストン修飾の異常は血糖治療で元に戻すことができるか、抗糖尿病薬ピオグリタゾンを用いて調べた。その結果、5 週令から治療によって血糖の上昇をある程度抑えても、DNA メチル化・ヒストン修飾異常およびそれに伴う発現変化のいずれもピオグリタゾンで改善させることはできなかった。この結果から、エピゲノム異常が遺伝子発現変化を固定化しているものと考えられた。以上の検討から、糖尿病により腎臓にエピゲノム異常が生じ、遺伝子発現変化が持続するために腎障害が進行するものと考えられた (Marumo et al *J Am Soc Nephrol* 2015)。

さらに異常メチル化を示す遺伝子の中には腎臓での機能が未報告のものが含まれていた。このうち核内受容体で腎臓障害に関わるものがあることがわかり、腎症進行治療の新たな対象として検討を進めている。

本研究により糖尿病によって、腎臓にアンジオテンシノーゲンや HGF 受容体など腎症進展に関わると思われる遺伝子にエピゲノム異常が生じることがわかった。エピゲノム異常を生じている遺伝子についてさらに詳細に検討を加えることにより、糖尿病性腎症の進行性に関わる治療標的が明らかになると期待される。また、今後エピゲノム異常が正しく把握できるようになればその進展度合い

に応じて 予防対策、エピゲノム作用薬による異常回復、エピゲノム異常遺伝子の下流に対して阻害薬や補充療法、と病期にあった治療法を選択することが可能になると思われる(下図)。

エピゲノム異常に基づく治療戦略



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

1. Rac1 - Mediated Activation of Mineralocorticoid Receptor in Pressure Overload-Induced Cardiac Injury. Nobuhiro Ayuzawa, Miki Nagase, Kohei Ueda, Mitsuhiro Nishimoto, Wakako Kawarazaki, Takeshi Marumo, Atsu Aiba, Takayuki Sakurai, Takayuki Shindo, Toshiro Fujita. *Hypertension*. 67, 99-106, 2016. DOI: 10. 1161/HYPERTENSIONAHA. 115.06054、査読あり
2. Diabetes Induces Aberrant DNA Methylation in the Proximal Tubules of the Kidney. Takeshi Marumo, Shinichiro Yagi, Wakako Kawarazaki, Mitsuhiro Nishimoto, Nobuhiro Ayuzawa, Atsushi Watanabe, Kohei Ueda, Junichi Hirahashi, Keiichi Hishikawa, Hiroyuki Sakurai, Kunio Shiota, Toshiro Fujita. *J Am Soc Nephrol*. 26, 2388-97, 2015. DOI: 10. 1681/ASN. 2014070665、査読あり

[学会発表](計11件)

1. Atsushi Watanabe, Takeshi Marumo, Wakako Kawarazaki, Mitsuhiro Nishimoto, Nobuhiro Ayuzawa, Daigoro Hirohama, Kohei Ueda, Hiroo Kumagai, Toshiro Fujita. Epigenetic abnormalities underlie increased expression of nuclear receptor PXR in diabetic kidney disease. *Kidney Week 2015 American Society of Nephrology, Annual Meeting*, 2015年11月6日, San Diego Convention Center, USA. 口頭発表
2. 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. 近位尿細管の核内受容体 Pxr は糖尿病腎症でエピゲノム変化を介して発現が更新する **第58回日本腎臓学会学術総会**, 2015年6月5 7

- 日 名古屋国際会議場、ポスター発表
3. 丸茂丈史 “Dysregulation of the epigenome in diabetic nephropathy” **第79回日本循環器学会学術集会** 会長特別企画「エピゲノムと循環器疾患」招待講演、2015年4月25日大阪国際会議場
 4. 丸茂丈史、八木慎太郎、河原崎和歌子、西本光宏、鮎澤信宏、渡邊篤史、上田浩平、菱川慶一、櫻井裕之、藤田敏郎、糖尿病性腎症にみられるエピジェネティック異常は血糖治療に抵抗性を示す **第88回日本内分沁学会学術総会** 2015年4月23日 ホテルニューオータニ 東京、ポスター発表
 5. 丸茂丈史 糖尿病性腎症にみられる治療抵抗性DNAメチル化異常 **第18回日本心血管内分沁代謝学会学術総会**、シンポジウム招聘講演、横浜、2014年11月22日
 6. 丸茂丈史 腎臓エピジェネティクス異常の診断・治療への応用の可能性. **第37回日本高血圧学会総会**、ワークショップ招聘講演、2014年10月18日、横浜
 7. 丸茂丈史 “Epigenetic modulation of diabetic nephropathy” **International Society of Nephrology (ISN) NEXUS Symposium** 招聘講演, Brisbane, Australia, 2014年9月27日.
 8. 丸茂丈史、八木慎太郎、河原崎和歌子、西本光宏、鮎澤信宏、上田浩平、渡邊篤史、藤田敏郎、糖尿病性腎症にみられる治療抵抗性DNAメチル化異常、東京、**第6回腎疾患と高血圧研究会**、2014年7月12日、口頭発表
 9. 丸茂丈史、八木慎太郎、河原崎和歌子、西本光宏、鮎澤信宏、渡邊篤史、菱川慶一、櫻井裕之、藤田敏郎、糖尿病性腎症にみられる治療抵抗性エピジェネティック異常 横浜、**第57回日本腎臓学会学術総会** 2014年7月4日、口頭発表
 10. 丸茂丈史 腎疾患にみられるエピジェネティック異常の意義 第80回関東小児腎臓研究会 招聘講演 2014年2月22日、東京
 11. 丸茂丈史 腎障害にかかわる細胞特異的なエピジェネティック異常 **第56回日本腎臓学会学術総会** ワークショップ 招聘講演 2013年5月12日、東京

〔図書〕(計2件)

1. 丸茂丈史、藤田敏郎 疾患とエピジェネティクス 腎疾患. エピジェネティクスキーワード事典 186-191, 2013
2. 丸茂丈史、下澤達雄 腎臓病にかかわるエピゲノム異常 - 糖尿病性腎症を中心に. 医学のあゆみ 255, 6, 691-696, 2015

6. 研究組織

(1) 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 臨

床エピジェネティクス講座・特任准教授
研究者番号：70265817

(2) 研究分担者

河原崎 和歌子 (KAWARAZAKI, Wakako)

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・特任研究員

研究者番号：50424594