

「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」  
平成 23 年度採択研究代表者

H24 年度  
実績報告

藤田 敏郎

東京大学先端科学技術センター・特任研究員(特任教授)

生活習慣病による進行性腎障害に関わるエピジェネティック異常の解明と  
診断・治療への応用

## §1. 研究実施体制

### (1)「藤田」グループ

① 研究代表者: 藤田敏郎 (東京大学先端科学技術センター、特任教授)

#### ② 研究項目

・腎障害に関わるエピジェネティック異常の解明と診断・治療への応用

### (2)「大庭」グループ

① 主たる共同研究者: 大庭成喜 (東京大学医学部附属病院腎臓内分泌内科・客員研究員)

#### ② 研究項目

・糖尿病性腎症における microRNA の役割の解明

### (3)「八木」グループ

① 主たる共同研究者: 廣澤 瑞子 (東京大学大学院農学生命科学研究科・助教(特任准教授))

#### ② 研究項目

・糖尿病性腎症における DNA メチル化の役割の解明

### (4)「丸茂」グループ

① 主たる共同研究者: 丸茂丈史 (東京大学先端科学技術センター・特任講師)

#### ② 研究項目

・糖尿病性腎症における DNA メチル化の役割の解明

### (5)「下澤」グループ

①主たる共同研究者：下澤達雄（東京大学医学部附属病院検査部・講師）

②研究項目

・高血圧性腎症における microRNA、DNA メチル化の役割の解明

## § 2. 研究実施内容

**研究1. 糖尿病モデルにおける microRNA 発現異常の同定と DNA メチル化異常の関連の検討（大庭グループ、丸茂グループ、八木グループ）**

### 1-1 microRNA 発現異常の検討

尿細管由来細胞株において TGFβ 刺激により pri-miR-21, 26b, 29c、pre-miR-21, 26b, 29c の発現低下と miR-21, 26b, 29c の発現亢進が誘導されることを明らかにした。また TGFβ 刺激により Drosha と smad の結合亢進が確認された。これらの結果から TGFβ 刺激により smad が Drosha に結合することで活性化され、pri-miR-21, 26b, 29c の processing が進むと考えられた。さらに miR-29c により Dnmt3b の発現が抑制されたことから、miR-29c が DNA のメチル化制御に関与している可能性を明らかにした。

### 1-2 TGFβ 刺激によるエピジェネティック異常の同定

TGFβ 刺激により Dnmt3b は collagen25, fibronectin, type IV collagen 遺伝子 CpG 領域への結合状態の変化が確認された。今後は TGFβ 刺激による線維化、epithelial mesenchymal transition 変化とエピジェネティック異常の関連について検討を進める。

### 1-3 高血糖負荷でのエピジェネティック異常の解明を目指した研究

さらに、糖尿病による腎機能障害のより直接的なモデルとして腎尿細管細胞株を糖で刺激すると TXNIP 遺伝子が 10 倍程度に発現が亢進した。TXNIP 遺伝子は酸化ストレス、炎症、アポトーシスと関連することから、今後 TXNIP 遺伝子に着目し、エピジェネティック異常の検討を進める。

## 2. 糖尿病モデル動物を用いた検討

db/db 糖尿病モデルマウスの腎臓で、近位尿細管での DNA メチル化異常を複数明らかにした。糖尿病性腎症進展に関与すると思われる遺伝子脱メチル化が糖尿病治療により予防可能であることが示唆された。

### 2-1. 近位尿細管細胞のゲノムワイドメチル化解析

糖尿病性腎症病態マウス（db/db）から分画した近位尿細管分画の D-REAM 解析を行い、腎臓を比較すると、転写因子や近位尿細管マーカー遺伝子に低メチル化 DMR を見いだすことができた。この転写因子は腎臓の分化に深く関わり、ラット尿細管での発現が知られており、DNA メチル化を含むエピジェネティック制御が尿細管の機能維持に重要であることが示唆された。次に D-REAM データを、報告されている db/db マウス腎臓のトランスクリプトームデータに照合することにより、病態依存的に低メチル化異常を呈す DMR を濃縮した。

### 2-2. 近位尿細管 DNA メチル化異常の治療への反応

抗糖尿病薬により糖尿病マウスを治療することにより低メチル化異常と発現増加が有意に抑制されることが確認され代謝コントロールの重要性が示唆された。一方、RAS 系降圧薬はメチル化異常抑制に対しては効果が弱いという結果が得られた。

### **2-3. ヒト近位尿細管培養細胞との比較**

エピゲノムは細胞・組織における機能発現の基盤であり、マウスとヒトのエピゲノムの比較は、モデルマウスの結果をヒトに外挿できるかについて重要な知見を与えてくれるものと考えられる。マウス近位尿細管分画、ヒト近位尿細管細胞の D-REAM 解析、および RNA 定量解析の結果から、上記の転写因子以外にエピジェネティック因子、糖代謝系を含む分子ネットワークが近位尿細管細胞のエピゲノムの特徴を描くのに重要であることが示唆された。

### **研究2 ヒト検体の標準化および D-REAM データベースの整備と解析法の改良 (八木、丸茂、下澤グループ)**

患者尿より各種尿細管を選別し、培養できることを確認した。

またヒト初代培養細胞を用いて D-REAM による DNA メチル化データベースの整備 (ゲノムバージョンを最新にした) により、2012 年に公表された ENCODE データとの照合を可能とした。一方未だスタンダードなエピゲノムデータベースがないマウスにおいては、Tagging 法による次世代シーケンサを用いた解析法の検討、ソーティングで分けた微量サンプルやマイクロダイセクションサンプルでの解析を検討した (1)。

### **研究3 高血圧性腎障害におけるエピジェネティクス修飾と治療への応用 (下澤グループ)**

高血圧性臓器障害に関わる因子である酸化ストレスとアンジオテンシン II (2-7) により変化する microRNA を in silico でスクリーニングし、実際に尿細管細胞を用いて変化する microRNA として miR29a を同定した。片腎摘出食塩負荷高血圧モデル動物の腎症では miR29a が低下することを確認し、腎臓局所に premiR29a をコラーゲンゲルマトリックスに埋め込み投与することで全身には影響を及ぼすことなく腎障害を改善できること明らかにした (Mori, Shimosawa, in revision)。

腎障害患者における内因性抗酸化物質である adrenomedullin の修飾について動物モデルおよび透析患者の解析を行った (4)。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ● 論文詳細情報

1. Wu G, Hirabayashi K, Sato S, Akiyama N, Akiyama T, Shiota K, Yagi S. DNA methylation profile of Aire-deficient mouse medullary thymic epithelial cells. *BMC Immunol* 13:58, 2012. (doi: 10.1186/1471-2172-13-58.)
2. Mu S, Shimosawa T, Fujita T. Reply to: Does a beta(2)-adrenergic receptor-WNK4-Na-Cl co-transporter signal cascade exist in the in vivo kidney? *Nat Med* 18(9):1325-1327, 2012.
3. Saito R, Shimosawa T, Ogihara T, Maruyama N, Fujita T, Okamura N, Nakahara K. Function of adrenomedullin in inflammatory response of liver against LPS-induced endotoxemia. *APMIS* 120:706-11, 2012. (doi: 10.1111/j.1600-0463.2012.02892.x)
4. Nikitenko L.L, Shimosawa T, Henderson S, Mäkinen T, Shimosawa H, Qureshi U, Pedley B, Rees M.C.P., Fujita T, Boshoff C. Adrenomedullin Haploinsufficiency Predisposes to Secondary Lymphedema. *J Invest Dermatol* in press. (doi: 10.1038/jid.2013.47.)
5. Kono R, Kanozawa K, Shimosawa T, Tayama Y, Matsuda A, Hasegawa H, Mitarai T. Adrenomedullin in peritoneal effluent expressed by peritoneal mesothelial cells. *Clin Exp Nephrol* in press