

「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

H25 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・名誉教授

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、特任研究員・名誉教授)
- ② 研究項目
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

(2)「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・准教授)
- ② 研究項目
生活習慣病による進行性腎障害に関わる DNA メチル化異常の解明

(3)「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
糖尿病による進行性腎障害に関わる DNA メチル化異常の解明と診断・治療への応用

(3)「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
生活習慣病による進行性腎障害、高血圧発症に関わる DNA メチル化ならびに microRNA の
関与の検討と診断・治療への応用

§ 2. 研究実施の概要

糖尿病性腎症は透析導入原疾患の第一位を保ち続けており、高血圧に伴う腎臓障害は透析原因疾患として年々割合を増加させている。生活習慣病にともなう腎臓障害に対する新たな治療法の開発は喫緊の課題である。本研究ではエピジェネティック異常が腎臓の性質を変化させ、生活習慣病にともなう腎臓障害を進行させる鍵になっていると考えて研究を進めている。腎臓は糸球体と尿細管から形成される基本単位ネフロンが左右 100 万個ずつ集まって成り立っている。構造も機能も異なるため糸球体と尿細管を分けて別個に検討を行っている。

糖尿病性腎症では糸球体の線維化の進行が腎機能悪化の原因となる。糸球体構成因子のメサンギウム細胞の線維化反応に着目し、ヒト培養細胞とモデル動物を用いて DNA メチル化の変化を調べた。その結果線維化関連分子で DNA 脱メチル化が生じていることが明らかになってきている。糸球体線維化に DNA メチル化異常が関わることを示唆され、成立機序の解明と治療介入の可能性について研究を進めている。

つぎに、尿細管での DNA メチル化異常を調べるため、腎臓のなかでも糖質代謝に関わりの強い近位尿細管のメチル化状態を調べた。正常マウスから近位尿細管細胞を細胞分離装置で分離して DNA メチル化を解析した。他の臓器とゲノムワイドに比較して近位尿細管細胞で特異的に DNA メチル化状態が変化している部位を同定した。その中でも、脱メチル化している遺伝子は mRNA 発現も上昇しており、トランスポーター、糖代謝酵素、刷子縁酵素、転写因子など近位尿細管特徴的な遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子は DNA メチル化レベルで腎臓内の発現が厳密にコントロールされ機能を発揮しているものと思われた。正常近位尿細管細胞のメチル化情報に基づいて糖尿病モデル db/db マウスにみられる近位尿細管 DNA メチル化変化を解析した。その結果、糖尿病で DNA メチル化が変化している遺伝子を複数抽出することができた。メチル化が増加するものは発現が減少し、脱メチル化するものは発現が増加しており、メチル化によって発現が変化していることが示唆された。これらの DNA メチル化異常は抗糖尿病治療を行っても抵抗性を示し、腎症が進行性である性質を示すことに関わる可能性が考えられる。

また、生活習慣病では、水電解質代謝・血圧調節を司るアルドステロンが標的臓器において鉱質コルチコイド受容体シグナルカスケードを過剰に活性化している。高血圧、臓器障害での過剰な鉱質コルチコイド受容体活性化機構とエピジェネティクスの関わりを解明するため、各種モデル動物を用いた解析を行っている。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報(国際)

1. Hayashi, M., Tojo, A., Shimosawa, T., and Fujita, T. 2013. The role of adrenomedullin in the renal NADPH oxidase and (pro)renin in diabetic mice. *J Diabetes Res* 2013:134395. doi 10.1155/2013/134395
2. Isshiki, M., Nishimoto, M., Mizuno, R., and Fujita, T. 2013. FRET-based sensor analysis reveals caveolae are spatially distinct Ca²⁺ stores in endothelial cells. *Cell Calcium* 54:395-403. doi 10.1016/j.ceca.2013.09.002
3. Jimbo, R., Kawakami-Mori, F., Mu, S., Hirohama, D., Majtan, B., Shimizu, Y., Yatomi, Y., Fukumoto, S., Fujita, T., and Shimosawa, T. 2013. Fibroblast growth factor 23 accelerates phosphate-induced vascular calcification in the absence of Klotho deficiency. *Kidney Int.* doi 10.1038/ki.2013.332
4. Oba, S., Mizutani, T., Suzuki, E., Nishimatsu, H., Takahashi, M., Ogawa, Y., Kimura, K., Hirata, Y., and Fujita, T. 2013. A useful method of identifying of miRNAs which can down-regulate Zeb-2. *BMC Res Notes* 6:470. doi 10.1186/1756-0500-6-470
5. Ogura, S., Shimosawa, T., Mu, S., Sonobe, T., Kawakami-Mori, F., Wang, H., Uetake, Y., Yoshida, K., Yatomi, Y., Shirai, M., and Fujita, T. 2013. Oxidative stress augments pulmonary hypertension in chronically hypoxic mice overexpressing the oxidized LDL receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 305:H155-162. doi 10.1152/ajpheart.00169.2012
6. Okamoto, T., Taguchi, M., Osaki, T., Fukumoto, S., and Fujita, T. 2013. Phosphate enhances reactive oxygen species production and suppresses osteoblastic differentiation. *J Bone Miner Metab.* doi 10.1007/s00774-013-0516-z
7. Yamamoto, T., Izumi-Yamamoto, K., Iizuka, Y., Shirota, M., Nagase, M., Fujita, T., and Gotoda, T. 2013. A novel link between Slc22a18 and fat accumulation revealed by a mutation in the spontaneously hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun* 440:521-526. doi 10.1016/j.bbrc.2013.09.096
8. Yamazaki, O., Yamada, H., Suzuki, M., Horita, S., Shirai, A., Nakamura, M., Satoh, N., Fujita, T., and Seki, G. 2013. Identification of dominant negative effect of L522P mutation in the electrogenic Na⁽⁺⁾-HCO₃⁽⁻⁾ cotransporter NBCe1. *Pflugers Arch* 465:1281-1291. doi 10.1007/s00424-013-1277-1
9. Arai, Y., Ohgane, J., Fujishiro, S.H., Nakano, K., Matsunari, H., Watanabe, M., Umeyama, K., Azuma, D., Uchida, N., Sakamoto, N., et al. 2013. DNA methylation profiles provide a viable index for porcine pluripotent stem cells.

Genesis 51:763-776. doi 10.1002/dvg.22423.

10. Hayakawa, K., Hirose, M., Tabei, Y., Arai, D., Tanaka, S., Murakami, N., Yagi, S., and Shiota, K. 2013. Epigenetic switching by the metabolism-sensing factors in the generation of orexin neurons from mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem* 288:17099-17110. doi 10.1074/jbc.M113.455899.
11. Tokuhara Y, Shukuya K, Tanaka M, Mouri M, Ohkawa R, Fujishiro M, Takahashi T, Okubo S, Yokota H, Kurano M, Ikeda H, Yamaguchi S, Inagaki S, Ishige-Wada M, Usui H, Yatomi Y, Shimosawa T. Detection of novel visible-light region absorbance peaks in the urine after alkalization in patients with alkaptonuria. *PLoS One* 2014 Jan 23;9(1):e86606. doi 10.1371/journal.pone.0086606.
12. Yoshida S, Ishizawa K, Ayuzawa N, Ueda K, Takeuchi M, Kawarazaki W, Fujita T, Nagase M. Local Mineralocorticoid Receptor Activation and the Role of Rac1 in Obesity-Related Diabetic Kidney Disease. *Nephron Exp Nephrol.* 2014 Feb 28;126(1):16-24. doi 10.1159/000358758
13. Ueda, K., Fujiki, K., Shirahige, K., Gomez-Sanchez, C.E., Fujita, T., Nangaku, M., and Nagase, M. 2014. Genome-wide analysis of murine renal distal convoluted tubular cells for the target genes of mineralocorticoid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 445:132-137. doi 10.1016/j.bbrc.2014.01.125
14. Yoshida S, Ishizawa K, Ayuzawa N, Ueda K, Takeuchi M, Kawarazaki W, Fujita T, Nagase M. Renin inhibition ameliorates renal damage through prominent suppression of both angiotensin I and II in human renin angiotensinogen transgenic mice with high salt loading. *Clin Exp Nephrol.* in press doi 10.1007/s10157-013-0893-6
15. Inoue T, Kohro T, Tanaka T, Kanki Y, Mimura I, Kobayashi M, Taguchi A, Maejima T, Suehiro J, Sugiyama A, Aruga H, Dong S, Stevens JF, Yamamoto S, Tsutsumi S, Fujita T, Aburatani H, Nangaku M, Kodama T, Wada Y. Cross-enhancement of ANGPTL4 by HIF1 alpha and PPAR delta is achieved by conformational proximity of two responsive elements. *Genome Biology* (in press).