

糖尿病性腎症に関わるエピジェネティック異常の解明

杏林大学医学部 薬理学教室

講師 丸茂 丈史

はじめに

わが国の透析人口は約30万人に達して増え続け、透析医療費は年間1兆円を超える。糖尿病性腎症は透析導入原因疾患の第一位であり約半数を占める。糖尿病性腎症に対する新たな治療手段の開発は喫緊の課題である。糖尿病性腎症がどのようなメカニズムで治療抵抗性に陥り進行するのか明らかにできれば、新たな糖尿病性腎症の治療法の開発につながられる。

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り、臓器特異的遺伝子発現など細胞の表現系の維持に重要な役割を果たしている。最近、高血糖によって生じたヒストン修飾異常が血管炎症の持続を引き起こすことが報告された。一方、糖尿病性腎症でのエピジェネティック異常は未解明である。これまでわたくし達は一貫して腎臓疾患に関わるエピジェネティック機構の意義について検討を加えてきた。ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬が腎炎モデルマウスの予後を改善し¹⁾、その効果はヒストン修飾変化に基づく線維化の抑制作用²⁾および、炎症性細胞の浸潤抑制作用³⁾によることを示した。さらに、HDAC5の減少は腎臓の内因性再生反応に関わることを示し⁴⁾、食塩感受性高血圧の成立機序に腎臓のHDAC8抑制が関与することを発表した⁵⁾。

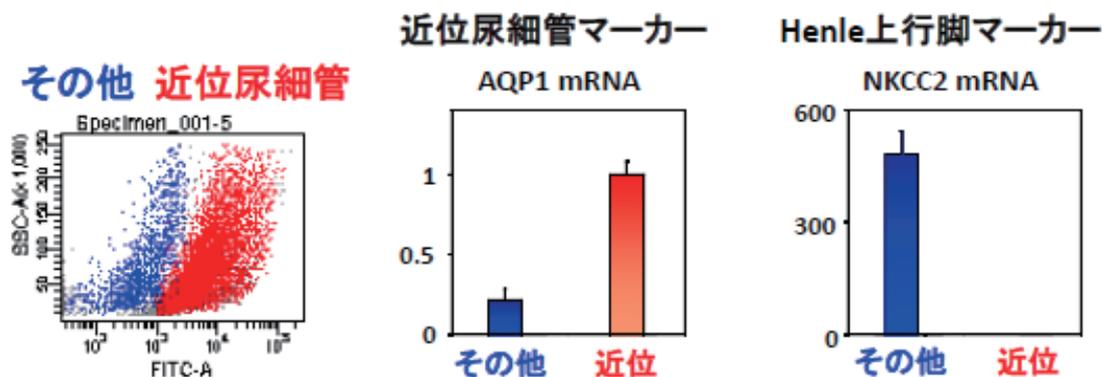
このように、これまでは主にヒストン修飾に焦点をあてて研究を進めてきたが、本研究ではエピジェネティック機構の中でも、より安定性が高く細胞記憶に関わるDNAメチル化が糖尿病性腎症で異常をきたしているかどうか検討を加えた。

考 察

糖尿病腎症モデルに10週令雄性db/dbマウスを用いた。腎症初期に発現変化する遺伝子を対象に同週令のdb/+を対照に腎臓DNAメチル化の異常をCOBRA法で解析した。糖尿病性腎症で変化が報告されている遺伝子をスクリーニングした結果、酸化ストレス過剰産生を介して高血圧や糖尿病による腎障害に関与することが示唆されているNADPH oxidase 4 (nox4)にDNAメチル化異常が生じていることが明らかになった。db/dbマウスでは5週から10週にかけて、経時的にnox4 mRNAが上昇した。それに伴い遺伝子のbodyで有意なDNA脱メチル化が生じ、promoter領域でも同様な脱メチル化が見られることが明らかになった。

わたくし達は、これまでの免疫組織化学を用いた検討で、ヒストン脱アセチル化酵素発現やヒストンアセチル化の変化が腎臓構成細胞間で大きく異なることを報告してきた^{3, 4)}。そ

のうえ、腎障害の進行に伴う線維芽細胞の増加や炎症性浸潤細胞は、腎臓構成細胞比率を変化させて臓器全体のエピジェネティックな状態を大きく変化させる。したがって構成細胞別の検討は必須である。わたくし達がこれまでに報告したセルソーターを用いて腎臓構成細胞を分取する手法⁶⁾を用いて近位尿細管を分取し検討した。その結果、ソートされた近位尿細管分画には近位尿細管選択的に発現する *sglt 2* や *aquaporin 1* mRNAの発現が集中しており、一方、*NKCC2* など非近位尿細管のマーカーはほとんど発現しておらず、分取が成功していることが確認できた (図)。



本法で得られた近位尿細管分画とその他の分画を用いて *nox4* 遺伝子のDNAメチル化を解析したところ、*db/+*、*db/db* マウスともに近位尿細管細胞の *nox4* 遺伝子は10%以下と低メチル状態である一方、非近位尿細管分画では50%以上の高メチル状態であることがわかった。さらに、*db/db* マウスでは、*db/+* に比して非近位尿細管での *nox4* promoter DNAのメチル化が有意に減少していた。

要 約

糖尿病性腎症で *nox4* DNAのメチル化が減少していることが明らかになった。*nox4* DNA脱メチル化は、おもに非近位尿細管で生じていると考えられた。こうした本来発現が低い部位での脱メチル化に基づいた *nox4* mRNAが増加は、持続的な異所性酸化的ストレスの増大をきたし腎症進展に関わる可能性が示唆された。

今後は、*nox4* のほかにもDNAメチル化異常が生じているかどうか検討を進める予定である。*nox4* のような増悪因子は脱メチル化し発現が増加する一方、保護因子の中にはメチル化によって働きが抑制されるものが存在すると予想される。本研究で解明されるエピジェネティック異常とその成立機序をターゲットとして新たな治療法が開発できるようになると考えられる。治療のみならず、腎臓細胞のエピジェネティック異常の解析によって不可逆性に陥っているかどうかの病期診断も可能になると期待される。厳格な血糖治療は糖尿病患者の初期には必要だが、進行した例ではかえって生命予後を悪化させることが知られている。その病

期の区切りは現在明確でないが、エピジェネティック解析に基づいた病期診断を、厳格な治療を行うかどうかの治療法選択に役立てることができると思われる。とくに腎臓細胞は尿から得られるため非侵襲的な診断を目指すことができる。

DNAメチル化異常形成過程の解明も重要である。DNAメチル化とヒストン修飾は互いに影響しあうことが知られているため、DNAメチル化が変化する前にはヒストン修飾のレベルの異常がみられると予想される。経時的に生じると考えられるヒストン異常を解明し、さらにその原因となる糖尿病での要因を明らかにしていく予定である。これらの異常形成過程の解明は、新たな糖尿病性腎症の治療標的の発見につながると考えている。

文 献

1. Imai N, Hishikawa K, Marumo T, et al: Inhibition of histone deacetylase activates side population cells in kidney and partially reverses chronic renal injury. *Stem Cells* 25: 2469-2475, 2007
2. Yoshikawa M, Hishikawa K, Marumo T, et al: Inhibition of histone deacetylase activity suppresses epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF-beta1 in human renal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 18: 58-65, 2007
3. Marumo T, Hishikawa K, Yoshikawa M, et al: Histone deacetylase modulates the proinflammatory and -fibrotic changes in tubulointerstitial injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 298: F133-141, 2010
4. Marumo T, Hishikawa K, Yoshikawa M, et al: Epigenetic regulation of BMP7 in the regenerative response to ischemia. *J Am Soc Nephrol* 19: 1311-1320, 2008
5. Mu S, Shimosawa T, Ogura S, et al: Epigenetic modulation of the renal beta-adrenergic-WNK4 pathway in salt-sensitive hypertension. *Nat Med* 17: 573-580, 2011
6. Hishikawa K, Marumo T, Miura S, et al: Musculin/MyoR is expressed in kidney side population cells and can regulate their function. *J Cell Biol* 169: 921-928, 2005