

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業 ユニットタイプ「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」

(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation  
Development of fundamental technologies for diagnosis and therapy  
based upon epigenome analysis

研究開発課題名： (日本語) 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

(英語) New diagnostic and therapeutic tools targeting epigenetic modulation  
for kidney disease caused by hypertension and diabetes

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京大学 先端科学技術研究センター  
名誉教授 藤田敏郎

所属 役職 氏名： (英語) Toshiro Fujita, Emeritus Professor, Research Center for Advanced  
Science and Technology, The University of Tokyo

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

わが国の透析人口は増え続け、なかでも糖尿病と高血圧を原因疾患とする末期腎不全患者数が増加している。高齢化社会で生活習慣病にともなう腎臓障害に対する新たな診断・治療法の開発は喫緊の課題である。糖尿病初期の血糖コントロールが悪いと後年に糖尿病性腎症が発症・進展しやすくなることが最近の臨床試験で明らかにされた。また、胎児が母体中でストレスを受けると産児に高血圧が発症しやすくなることも知られている(Barker 仮説)。これらの現象は、悪い血糖コントロールやストレスが何等かの機序で身体に記憶されることを示している。エピジェネティクスは細胞の記憶に関わるため、高血圧と腎臓障害進行の元にエピジェネティック異常が想定された。

本研究により、母体のストレスは、産児の視床下部でアンジオテンシン II 受容体 1a のプロモーター領域の DNA を脱メチル化して発現を増加させ、高血圧を発症させることが明らかになった。この知見は

胎児期のストレスが高血圧を発症させる Barker 仮説の分子機構にエピジェネティック異常が関わることを示している。さらに加齢と高血圧の発症にエピゲノム異常が示唆される遺伝子について検討を進めてきている。AME 症候群の原因遺伝子 11βHSD2 の DNA メチル化レベルは高血圧と関連する。腎臓特異的 11βHSD2 欠損マウスでは尿細管の鉱質コルチコイド受容体が活性化されて高血圧が生じること(*Hypertension* 2017)を明らかにした。カリウム代謝と血圧の新知見(*Hypertension* 2017, *BBRC* 2016)をふくめ、一連のエピゲノム異常の研究は高血圧の発症前治療やオーダーメイド治療につなげられる。

腎疾患治療には早期診断が必須であるが手段は限られている。腎臓エピゲノム情報を尿診断に利用できるか検討を進め、尿中落下未分化細胞により透析導入までの期間を予測できることが明らかになった(*Clin Chim Acta* 2016)。またヒト正常近位尿細管特異的 DNA メチル化情報を用いることにより尿細管障害を診断可能であることを見出し、糖尿病性腎症患者で診断的意義の検討を進めている。

糖尿病性腎症の進行に関わるエピジェネティック異常を明らかにするため、糸球体と近位尿細管に分けて分析した。近位尿細管では、アンジオテンシノーゲンなどの遺伝子に DNA メチル化異常が生じることを見出した (*J Am Soc Nephrol* 2015)。また糸球体にも TGF-β に異常メチル化が認められている。DNA メチル化異常は血糖治療に抵抗性を示したことから、メチル化異常が腎症のメモリー現象に関わると考えられた。さらに糸球体のメサングウム細胞特異的 DNA メチル化異常は抗酸化薬で治療可能である成績が得られており、エピジェネティック異常を対象とした血糖降下以外の治療法開発も可能であると思われる。糖尿病モデルでのエピジェネティック異常をヒトで検証するため糖尿病性腎症患者の生検組織を用いて解明を進めている。

以上の検討から、腎臓と血圧中枢のエピジェネティック異常が高血圧と腎臓障害の発症に関わるようになった。高血圧と糖尿病性腎症の予防には、妊娠期からの管理や糖尿病早期の血糖管理によりエピジェネティック異常の発生を抑えることが重要であると思われる。またエピゲノム作用薬やエピジェネティック異常をもつ因子に対する介入治療が高血圧と腎疾患に有効であると思われる。さらに腎臓エピゲノム情報による腎臓病診断法の臨床応用は腎臓病の早期診断・治療につながるものと期待される。

The number of patients requiring dialysis has been increasing in Japan. Diabetes and hypertension are the leading causes of end stage renal disease. In our aging society, new diagnostic and therapeutic maneuvers against kidney diseases with hypertension and diabetes are urgently needed. Clinical studies revealed that poor glycemic control in the early stage of diabetes exerts detrimental effects on development of kidney disease in the later life (metabolic memory). In addition, individuals with poor intrauterine growth are susceptible to adult-onset hypertension (Barker's hypothesis). The mechanisms underlying these memory phenomena have not been fully clarified although epigenetic abnormalities may be involved.

In the present study, we found that maternal stress during pregnancy increased angiotensin II receptor 1a expression in the paraventricular nucleus of the brain obtained from the offspring mice. Increased angiotensin II receptor 1a, accompanied by DNA demethylation, led to hypertension. These results indicate that epigenetic abnormalities underlie the molecular mechanisms of Barker's hypothesis. We also extended our study to genes related to aging and hypertension. The levels of DNA methylation of 11βHSD2, deficiency of which causes AME syndrome, are correlated with hypertension. We clarified that kidney specific deletion of 11βHSD2 caused hypertension by increasing mineralocorticoid receptor activation in renal tubules (*Hypertension* 2017). Together with

new findings about potassium metabolism (*Hypertension* 2017, *BBRC* 2016), the series of studies about epigenetic abnormalities may pave a way to the preemptive and personalized medicine against hypertension.

New means for early diagnosis of chronic kidney disease are needed for the appropriate treatment. We are trying to develop novel methods using epigenetic information of the kidney. We found that the number of undifferentiated tubular cells in the urine predicts the induction of hemodialysis (*Clin Chim Acta* 2016). We also found that tubular injury can be detected using the normal proximal DNA methylation profile, and are studying the diagnostic significance of DNA methylation for diabetic kidney disease.

To clarify epigenetic abnormalities involved in the development of diabetic kidney disease, we analyzed DNA methylation levels in a cell-type specific manner. We reported that genes including angiotensinogen exhibit aberrant DNA methylation in the proximal tubular cells in the diabetic kidney (*J Am Soc Nephrol* 2015). We also found that TGF-beta is demethylated in mesangial cells obtained from diabetic mice. DNA methylation abnormalities were resistant to diabetic therapy, suggesting that epigenetic derangement underlie persistent expression of these genes. We are studying DNA methylation abnormalities in the kidney of diabetic patients using biopsy samples.

In conclusion, we have provided ample evidence showing involvement of epigenetic abnormalities in hypertension and kidney disease. Therapeutic approach to avoid formation of epigenetic abnormalities may be important for prevention of development of hypertension and kidney disease. We also demonstrate that epigenetic information may be useful for diagnosis and treatment for the early stage of diabetic kidney disease.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1件、国際誌 4件）

1. Kohei Ueda, Mitsuhiro Nishimoto, Daigoro Hirohama, Nobuhiro Ayuzawa, Wakako Kawarazaki, Atsushi Watanabe, Tatsuo Shimosawa, Johannes Loffing, Ming-Zhi Zhang, Takeshi Marumo, and Toshiro Fujita: Renal dysfunction induced by kidney-specific gene deletion of Hsd11b2 as a primary cause of salt-dependent hypertension. **Hypertension**, in press, 2017
2. Xu N, Hirohama D, Ishizawa K, Chang WX, Shimosawa T, Fujita T, Uchida S, Shibata S. Hypokalemia and pendrin induction by aldosterone. **Hypertension**, in press, 2017
3. Ishizawa K, Xu N, Loffing J, Lifton RP, Fujita T, Uchida S, Shibata S. Potassium depletion stimulates Na-Cl cotransporter via phosphorylation and inactivation of the ubiquitin ligase Kelch-like 3. **Biochem Biophys Res Commun**. 480: 745-751, 2016.
4. Currie G, Taylor AH, Fujita T, Ohtsu H, Lindhardt M, Rossing P, et al. Effect of mineralocorticoid receptor antagonists on proteinuria and progression of chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. **BMC Nephrol**. 2016;17(1):127

- 丸茂丈史, 藤田敏郎. 【エピゲノム研究】第3章 疾患エピゲノム研究 高血圧・腎疾患のエピゲノム異常 環境因子とメタボリックメモリー. 実験医学増刊. 34:128-33, 2016.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

- 鮎澤信宏, 上田浩平, 広浜大五郎, 西本光宏, 河原崎和歌子, 渡邊篤史, 丸茂丈史, 藤田敏郎: 間在細胞 EGFP 標識マウスを用いた間在細胞分取・解析法の確立. 第 59 回 日本腎臓学会学術総会、2016 年 6 月 18 日、横浜 (ポスター.)
- 河原崎和歌子, 丸茂丈史, 西本光宏, 鮎澤信宏, 広浜大五郎, 上田浩平, 渡邊篤史, 藤田敏郎: 抗加齢因子 Klotho 発現低下に伴う食塩感受性高血圧発症機序の解明. 第 59 回 日本腎臓学会学術総会、2016 年 6 月 16 日、横浜 (口頭)
- 広浜大五郎, 柴田茂, 上田浩平, 鮎澤信宏, 西本光宏, 河原崎和歌子, 渡邊篤史, 丸茂丈史, 藤田敏郎: Pendrin と NCC 発現調節におけるアンジオテンシン II とアルドステロンの異なる役割. 第 59 回 日本腎臓学会学術総会、2016 年 6 月 16 日、横浜 (口頭)
- 丸茂丈史, 藤田敏郎: 腎臓エピゲノム情能に基づく生活習慣病に対する治療戦略. 第 39 回日本高血圧学会総会、2016 年 9 月 30 日、仙台 (口頭)
- 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: 糖尿病性腎症で核内受容体 PXR はエピジェネティクス異常をきたし線維化因子 RGC32 を増加させる. 第 59 回 日本腎臓学会学術総会、2016 年 6 月 17 日、横浜 (口頭)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業 ユニットタイプ「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」

(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation  
Development of fundamental technologies for diagnosis and therapy  
based upon epigenome analysis

研究開発課題名： (日本語) 生活習慣病による進行性腎障害にかか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

(英語) New diagnostic and therapeutic tools targeting epigenetic modulation  
for kidney disease caused by hypertension and diabetes

研究開発担当者 (日本語) 東京大学先端科学研究センター 名誉教授 藤田敏郎

所属 役職 氏名： (英語) Toshiro Fujita, Emeritus Professor, Research Center for Advanced  
Science and Technology, The University of Tokyo

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 高血圧、糖尿病モデル、患者を用いた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

開発課題名： (英語) Analysis and application of DNA methylation in relation with renal  
dysfunction of hypertensive and diabetic model animal and patients.

研究開発分担者 (日本語) 東京大学医学部附属病院 講師 下澤 達雄

所属 役職 氏名： (英語) Dept of Clinical Lab, University of Tokyo Lecturer Tatsuo Shimosawa

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者： 東京大学先端科学研究技術センター 藤田敏郎 総括研究報告を参照。

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）

1. Shukuya K, Ogura S, Tokuhara Y, Okubo S, Yatomi Y, Tozuka M, Shimosawa T.  
Novel Round Cells in Urine Sediment and Their Clinical Implications.  
*Clinica Chimica Acta*. 457:142-9, 2016.
2. Hirohama D, Kawakami-Mori F, Ogura S, Mu S, Jimbo R, Uetake U, Yatomi Y, Nangaku M, Fujita T, Shimosawa T.  
Renal Denervation Improves Cardiac Diastolic Dysfunction by Restoring Serca2a Transcription in Uninephrectomized Rats.  
*J Hypertens (Los Angel)* 5:225. doi:10.4172/2167-1095.1000225,2016.
3. Watanabe S, Ogasawara T, Tamura Y, Saito T, Ikeda T, Suzuki N, Shimosawa T, Shibata S, Chung UI, Nangaku M, Uchida S. Targeting gene expression to specific cells of kidney tubules in vivo, using adenoviral promoter fragments. *PLoS One*. 12:e0168638, 2017
4. Cong-hui Wang Zheng Wang Li-juan Liang Xiang-ting Wang Xue-lian Ma Bei-bei Liu Jia-qi He Tatsuo Shimosawa Qing-you Xu The Inhibitory Effect of Eplerenone on Cell Proliferation in the Contralateral Kidneys of Rats with Unilateral Ureteral Obstruction. *Nephron* 2017 in press

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Wang C, Wang Z, Lang L, Xu Q, Shimosawa T. ポスター The effect of eplerenone on cell proliferation in contralateral kidney of rats with unilateral ureteral obstruction. The 26<sup>th</sup> Scientific meeting of the International Society of Hypertension, Seoul, 2016 Sept.
2. Reheman L, Hirohama D, Koid S S, Wang C, Mori F, Yeerbolati A, Liu B, Yatomi Y, Shimosawa T. 口頭 Mineralcorticoid receptor responsible for salt induced COX2 expression in renal medulla. The 26<sup>th</sup> Scientific meeting of the International Society of Hypertension, Seoul, 2016 Sept.
3. Yeerbolati A, Ogura S, Reheman L, Wang C, Liu B, Kuwahira I, Shirai M, Shimosawa T, Fujita T. ポスター The mechanism of salt sensitive hypertension in intermittent hypoxia. The 26<sup>th</sup> Scientific meeting of the International Society of Hypertension, Seoul, 2016 Sept.

#### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

#### (4) 特許出願

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業 ユニットタイプ「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」  
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation  
Development of fundamental technologies for diagnosis and therapy based upon epigenome analysis
- 研究開発課題名： (日本語) 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  
(英語) New diagnostic and therapeutic tools targeting epigenetic modulation for kidney disease caused by hypertension and diabetes
- 研究開発担当者  
所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人東京大学 先端科学技術研究センター 名誉教授 藤田敏郎  
(英語) Toshiro Fujita, Emeritus Professor, Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究  
開発課題名： (日本語) 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と診断・治療への応用  
(英語) Development of novel diagnostic and therapeutic tools against aberrant DNA methylation involved in kidney disease by hypertension and diabetes
- 研究開発分担者  
所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人東京大学 先端科学技術研究センター 特任准教授 丸茂丈史  
(英語) Takeshi Marumo, Project Associate Professor, Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo

## II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：国立大学法人東京大学先端科学技術研究センター・藤田敏郎 総括研究報告を参照。

## III. 成果の外部への発表

### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1件、国際誌 3件）

1. Kohei Ueda, Mitsuhiro Nishimoto, Daigoro Hirohama, Nobuhiro Ayuzawa, Wakako Kawarazaki, Atsushi Watanabe, Tatsuo Shimosawa, Johannes Loffing, Ming-Zhi Zhang, Takeshi Marumo, and Toshiro Fujita: Renal dysfunction induced by kidney-specific gene deletion of Hsd11b2 as a primary cause of salt-dependent hypertension. Hypertension, in press, 2017
2. 丸茂丈史, 藤田敏郎. 【エピゲノム研究】第3章 疾患エピゲノム研究 高血圧・腎疾患のエピゲノム異常 環境因子とメタボリックメモリー. 実験医学増刊. 34:128-33, 2016.
3. 丸茂丈史. 糖尿病性腎症におけるエピゲノム異常 医学のあゆみ 260, 674-5, 2017
4. 丸茂丈史, 下澤達雄. 【クリニカルエピゲノミクス】各種疾患 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 別冊医学のあゆみ 116-121, 2016

### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 丸茂丈史 : エピジェネティクス情報に基づく腎臓病へのアプローチ. 第46回日本腎臓学会東部学術大会、2016年10月8日、東京(招待講演)
2. 丸茂丈史 : Therapeutic strategy against diabetic kidney disease based on the epigenetic information of the kidney. 第90回日本薬理学会年会、2017年3月17日 長崎(招待講演)
3. 鮎澤信宏, 上田浩平, 広浜大五郎, 西本光宏, 河原崎和歌子, 渡邊篤史, 丸茂丈史, 藤田敏郎 : 間在細胞 EGFP 標識マウスを用いた間在細胞分取・解析法の確立. 第59回 日本腎臓学会学術総会、2016年6月18日、横浜 (ポスター.)
4. 河原崎和歌子, 丸茂丈史, 西本光宏, 鮎澤信宏, 広浜大五郎, 上田浩平, 渡邊篤史, 藤田敏郎 : 抗加齢因子 Klotho 発現低下に伴う食塩感受性高血圧発症機序の解明. 第59回 日本腎臓学会学術総会、2016年6月16日、横浜 (口頭)
5. 広浜大五郎, 柴田茂, 上田浩平, 鮎澤信宏, 西本光宏, 河原崎和歌子, 渡邊篤史, 丸茂丈史, 藤田敏郎 : Pendrin と NCC 発現調節におけるアンジオテンシン II とアルドステロンの異なる役割. 第59回 日本腎臓学会学術総会、2016年6月16日、横浜 (口頭)
6. 丸茂丈史, 藤田敏郎 : 腎臓エピゲノム情能に基づく生活習慣病に対する治療戦略. 第39回日本高血圧学会総会、2016年9月30日、仙台 (口頭)

7. 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: 糖尿病性腎症で核内受容体 PXR はエピジェネティクス異常をきたし線維化因子 RGC32 を増加させる. 第 59 回 日本腎臓学会学術総会、2016 年 6 月 17 日、横浜 (口頭)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業 ユニットタイプ「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」  
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation  
Development of fundamental technologies for diagnosis and therapy  
based upon epigenome analysis

研究開発課題名： (日本語) 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  
(英語) New diagnostic and therapeutic tools targeting epigenetic modulation  
for kidney disease caused by hypertension and diabetes

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京大学 先端科学技術研究センター  
名誉教授 藤田敏郎

所属 役職 氏名： (英語) Toshiro Fujita, Emeritus Professor, Research Center for Advanced  
Science and Technology, The University of Tokyo

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 高血圧性腎障害におけるエピジェネティック異常の解析  
開発課題名： (英語) Hypertensive kidney injury and epigenetic alterations

研究開発分担者 (日本語) 帝京大学医学部 内科学講座 准教授 柴田 茂

所属 役職 氏名： (英語) Shigeru Shibata, Associate Professor, Department of Internal Med,  
Teikyo University

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者： 東京大学先端科学技術研究センター・藤田敏郎教授 総括研究報告を参照。

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）

1. Shibata S. Mineralocorticoid receptor and NaCl transport mechanisms in the renal distal nephron. **J Endocrinol.** 2017 (in press)
2. Xu N, Hirohama D, Ishizawa K, Chang WX, Shimosawa T, Fujita T, Uchida S, Shibata S. Hypokalemia and pendrin induction by aldosterone. **Hypertension.** 2017 (in press)
3. Shibata S, Ishizawa K, Uchida S. Mineralocorticoid receptor as a therapeutic target in chronic kidney disease and hypertension. **Hypertens Res.** 40: 221-225, 2017
4. Ishizawa K, Xu N, Loffing J, Lifton RP, Fujita T, Uchida S, Shibata S. Potassium depletion stimulates Na-Cl cotransporter via phosphorylation and inactivation of the ubiquitin ligase Kelch-like 3. **Biochem Biophys Res Commun.** 480: 745-751, 2016.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Regulation of mineralocorticoid receptor signals in the kidney. 口頭発表、Shigeru Shibata, Hypertension Summit, 2016年5月、国内(京都)
2. Regulation of mineralocorticoid receptor signals in the kidney. 口頭発表、Shigeru Shibata, KSN 2016, 2016年5月、国外(韓国)
3. 腎におけるアルドステロンシグナルの修飾メカニズム. 口頭発表、柴田 茂、第17回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会, 2016年9月、国内(東京)
4. Hypertension and the kidney: recent advances. 口頭発表、Shigeru Shibata, The 17<sup>th</sup> International SHR symposium / The 52<sup>nd</sup> annual meeting of the society for hypertension related disease model research, 2016年9月、国内(東京)
5. Regulation of mineralocorticoid receptor signaling in the kidney. 口頭発表、Shigeru Shibata, ISH 2016 satellite symposium (RAAS 2016), 2016年9月、国内(東京)
6. 腎臓からみた食生活習慣と高血圧. 口頭発表、柴田 茂、第39回日本高血圧学会総会, 2016年10月、国内(仙台)
7. 腎臓における鉱質コルチコイド受容体シグナルの制御機構. 口頭発表、柴田 茂、第24回ステロイドホルモン学会学術集会, 2016年12月、国内(大分)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当なし

(4) 特許出願  
該当なし