

# 論文の要旨

申請者 渡 邊 篤 史

## 研究論文題目

糖尿病腎における核内受容体 PXR のエピジェネティクス異常とその役割についての研究

### 1 緒言・背景

糖尿病性腎症は、日本において現在透析導入原因疾患の約半数を占め、臨床上非常に重要な疾患である。しかし、いまだその発症・進展機序には未解明な点が多い。糖尿病性腎症の機序解明を目標に研究を行った。

大規模臨床試験 Diabetes Control and Complications trial (DCCT)、Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study において、糖尿病初期の血糖コントロールの可否が、その後長期にわたる糖尿病性腎症発症に強く関与することが示唆された。このような現象をメタボリックメモリーと呼ぶ。メタボリックメモリーの機序にエピジェネティクスの関与が考えられている。エピジェネティクスは遺伝子発現制御機構で、細胞分化や癌細胞の形質維持に関与し、情報が強固に保持される性質を持つためである。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の藤田敏郎教授・丸茂丈史准教授に指導を乞い、共同研究という形で研究を行った。丸茂先生らは、これまで、糖尿病では近位尿細管にエピジェネティクス異常が起こり治療抵抗性の遺伝子発現変化が生じることを報告している。この先行研究において、糖尿病モデルマウスの近位尿細管 DNA メチル化変化をゲノムワイドに検索する過程で、近位尿細管内の核内受容体 PXR に注目した。PXR は、肝・小腸・腎に主に存在し、肝臓では薬物代謝および耐糖能異常・糖新生に関与することが知られているが、腎臓内の PXR の分布や機能に関しての報告は無い。よって、本研究では、まず腎臓内 PXR の発現およびエピジェネティクスの糖尿病における変化を、続いて、腎臓内 PXR の糖尿病における役割について検討した。

### 2 研究方法

正常マウスとして C57B6/J マウスを、糖尿病モデルマウスとしてレプチン受容体遺伝子異常を持つ 2 型糖尿病モデルである *db/db* マウスを用いた。エピジェネティクス情報は、細胞特異的にその内容が異なるため、腎臓内で最も細胞数の多い近位尿細管に注目し、近位尿細管をレクチンで標識してセルソーターで分離し、近位尿細管およびその他の腎組織における PXR のエピジェネティクス情報・遺伝子発現を分析した。遺伝子発現は qRT-PCR 法で測定した。DNA メチル化は Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) 法、ヒストン修飾は Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) 法を用いてそれぞれ定量的に解析した。培養細胞における検討はヒト近位尿細管培養細胞である HK2 細胞を用いて行った。また、糖尿病性腎症に関与し得る遺伝子の発現変化も、PXR アゴニストの投与を行って網羅的に検索した。発現変化を認めた遺伝子について、siRNA を用いた PXR ノックダウンに

より変化が抑制されるか *in vitro* で検討するとともに、*db/db* マウスで *in vivo* の発現を調べた。

### 3 研究結果

#### 3-1 腎臓内 PXR の発現およびエピジェネティクスの、糖尿病における変化

正常マウス腎臓内では、*Pxr* mRNA は近位尿細管に特異的に発現していた。*Pxr* プロモータ領域近傍の DNA は、近位尿細管においてその他の腎細胞と比較し有意に脱メチル化しており、発現亢進型変化を呈していた。

一方、*db/db* マウスの腎臓内 *Pxr* mRNA をみると、*db/m* マウスと比較して有意に発現が多かった。*db/db* マウスの *Pxr* プロモータ領域近傍の DNA は、*db/m* マウスと比較し有意に脱メチル化する部位を認めた。発現亢進型のヒストン修飾である H3K9 アセチル化および H3K4 トリメチル化も *db/db* マウスにおいて有意に多かった。

腎 PXR におけるエピジェネティクスと発現の関係性を調べるため、HK2 細胞に DNA メチル化酵素阻害薬である 5-*aza*-2'-deoxycytidine を投与し、*PXR* DNA を脱メチル化させたところ、*PXR* mRNA 発現は亢進した。

以上の結果から、腎臓内 PXR 発現はエピジェネティクスによって制御されており、*db/db* マウスの近位尿細管ではエピジェネティクスの変化を介して PXR の発現が亢進していることが示唆された。

#### 3-2 腎臓内 PXR の糖尿病における役割

*db/m* マウスへの PXR アゴニスト (Pregnane-16 $\alpha$ -carbonitrile) を 100mg/kg/day 二日間腹腔内投与したところ、腎臓内の線維化遺伝子 *Rgc32*、糖新生酵素遺伝子 *Pck1*、薬物代謝トランスポータ遺伝子 *Slco2b1* の mRNA 発現が増加した。HK2 細胞においても、これらの遺伝子発現は PXR アゴニスト (Rifampicin) 投与で濃度依存性に増加した。HK2 細胞の *PXR* を siRNA でノックダウンすると、これらの遺伝子の発現およびアゴニスト投与による発現亢進は有意に抑制された。

*db/db* マウスの腎臓でも、これらの遺伝子発現は *db/m* マウスと比較すると *Pxr* DNA 脱メチル化に伴い有意に増加していた。

以上の結果から、腎臓内 PXR は、線維化、糖新生、薬物代謝遺伝子の発現を制御しており、*db/db* マウスの腎臓では、PXR の発現亢進によりそれらの遺伝子発現が増加していることが示唆された。

### 4 結論

腎臓内 PXR はエピジェネティクスにより制御されており、糖尿病ではエピジェネティクス変化によって PXR 発現が亢進し、線維化、糖新生、薬物代謝関連遺伝子の発現増加につながっていることが示唆された。腎臓内 PXR のエピジェネティクス変化が、糖尿病性腎症および糖尿病の進展に関与する可能性が示唆された。