

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

わたなべ あつし

渡 邊 篤 史

(腎臓病学専攻)

防衛医科大学校

平成 29 年度

目次

第1章 緒言	1 頁
第2章 方法	5 頁
第1節 使用動物	5 頁
第2節 細胞ソーティング	5 頁
第3節 定量ポリメラーゼ連鎖反応	6 頁
第4節 Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)法	6 頁
第5節 クロマチン免疫沈降法	7 頁
第6節 培養細胞	7 頁
第7節 small interfering RNA (siRNA) による <i>PXR</i> ノックダウン	7 頁
第8節 統計解析	8 頁
第3章 結果	9 頁
第1節 腎臓内 <i>PXR</i> の発現およびエピジェネティクス制御と、糖尿病におけるそれらの変化	9 頁
第1項 マウス正常腎組織での <i>PXR</i> 発現およびエピジェネティクス情報	9 頁
第2項 糖尿病モデルマウスでの <i>PXR</i> 発現とエピジェネティクス情報の変化	9 頁
第3項 エピジェネティクス情報変化がもたらす <i>PXR</i> mRNA 発現の変化	11 頁
第4項 小括	11 頁
第2節 腎臓内 <i>PXR</i> の糖尿病における役割	11 頁
第1項 <i>PXR</i> アゴニストと糖尿病による、 <i>Slco2B1</i> 、 <i>Pck1</i> 、 <i>Rgc32</i> 遺伝子	

の発現増加	1 1 頁
第 2 項 3 遺伝子と PXR の関連性の検討	1 2 頁
第 3 項 小括	1 3 頁
第 4 章 考察	1 4 頁
第 5 章 総括	1 9 頁
謝辞	2 0 頁
引用文献	2 1 頁
図表	2 7 頁

第1章 緒言

糖尿病性腎症は、慢性腎臓病の原因の多くを占め、臨床上非常に重要な疾患である。糖尿病治療の進展にも関わらず、糖尿病性腎症患者は増加している(1)。しかし、その発症機序は未解明な点が多い。糖尿病性腎症の発症機序を解明し、新規治療が開発されることが強く期待される場所である。

1型糖尿病患者を被験者として、1983年から約10年間に渡って行われた大規模臨床試験 Diabetes Control and Complications trial (DCCT)では、当時の一般的治療法群と血糖の厳格な管理を行った強化療法群を比較すると、強化療法群で、初期糖尿病性腎症の指標である微量アルブミン尿が有意に抑制されていた(2)。興味深いことに、その後引き続き実施された Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study において、両群の被験者は共に強化療法を受け、血糖値は両群均等にコントロールされるようになったにもかかわらず、DCCT で一般治療を受けた群の被験者において、腎機能低下が有意に多く認められた(3, 4)。この結果は糖尿病初期の血糖コントロールが、その後の糖尿病性腎症の発症に関与することを示唆するものであった。このように糖尿病の高血糖状態の影響が長い期間維持される現象についてメタボリックメモリーと呼ばれている。糖尿病性腎症ではメタボリックメモリーが起こる機序として有力なものとして、エピジェネティクスが示唆されている(5)。

エピジェネティクスは、近年注目されつつある遺伝子発現制御機構である。多細胞生物の一個体において、個々の細胞のDNA配列は基本的にすべて同じであるが、一旦細胞が分化して上皮や神経細胞になれば、その形態を維持するようになる。この分化・形態維持は、同一のDNA配列からどの遺伝子を発現させるかについて、持続的な制御がなされることによる。その機構を担うのがエピジェネティクスである。現在主にエピジェネティクスとして研究されているも

のとして、DNA のメチル化、ヒストン修飾、non-coding RNA (ncRNA)による制御がある(6) (図ア)。DNA の配列上で、シトシン、グアニンが並ぶ CpG と呼ばれる場所にあるシトシンは、メチル化修飾を受けることが出来る。CpG のメチル化が多い領域はクロマチンが凝集し、クローズドクロマチンと呼ばれる状態になる。これにより、転写因子等の結合が阻害され、その領域に存在する遺伝子の転写が抑制される。CpG は、遺伝子の転写開始点 (Transcription Start Site: TSS)近傍に豊富に存在し、一般的に TSS 近傍の CpG は他の部位の CpG に比較して脱メチル化していることが多く、転写調節に関与している。ヒストンの翻訳後修飾もエピジェネティクスに関与する。DNA がその周りに巻き付くことでヌクレオソームを形成するヒストンは、N 末端が飛び出した構造を持ち、この部位をヒストンテイルと呼ぶ。ヒストンテイルの末端からアミノ酸配列で 4 番目、20 番目に存在するリジン等が、アセチル化やメチル化等の修飾を受けることで、DNA メチル化と同様に、その周囲のクロマチンの構造変化に関与し、遺伝子発現を調節する。ncRNA は、タンパク質をコードする mRNA と異なり、タンパク質をコードしない RNA に対する総称で、近年、多種多様な ncRNA が発見され、ncRNA が遺伝子発現制御に重要な役割を持つことが明らかにされつつある。DNA 配列と同様に、DNA メチル化やヒストン修飾等のエピジェネティクス情報は、細胞分裂後も娘細胞に伝達され情報が保持される。DNA 配列ほど保存性は高くないが、一旦分化した細胞は発現遺伝子上のこれらエピジェネティクス情報がその後細胞分裂を経てもコピーされ形質が維持される。このエピジェネティクスの持つ持続性が、糖尿病によるメタボリックメモリーの原因であることが想定されている(7, 8)。

エピジェネティクスは細胞特異的にその情報が異なる。複数の細胞が混在した検体のエピジェネティクス情報を解析しても、組成細胞の比率によって特定

の遺伝子のエピジェネティクス情報が変化する。よって、エピジェネティクス情報の変化や異常を論じるためには、単一の細胞のエピジェネティクス情報を解析する必要がある。例えば、*SGLT2* 遺伝子は近位尿細管にほとんどが発現し、近位尿細管では *SGLT2* 遺伝子周囲の DNA はほとんどが脱メチル化しているが、その他の腎臓内の細胞ではほとんどがメチル化している(9)。近位尿細管内の *SGLT2* 遺伝子 DNA メチル化に変化が無くても、その他の細胞が多く含まれた検体を解析すると、*SGLT2* の総合的な DNA メチル化率は上昇してしまう。そこで先行研究(9)では、腎臓内で最も細胞数の多い近位尿細管に注目して解析を行った。糖尿病では近位尿細管にエピジェネティクス異常が生じ、治療抵抗性の遺伝子発現変化をもたらすことが示された(9)。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、核内受容体 PXR (Pregnane X Receptor) に注目した。

PXR は、薬物代謝に関与する受容体として初めてその役割が報告され(10)、肝・小腸・腎に主に発現していることが知られている(11)。これまでの研究により、PXR は様々な役割を持っていることが報告された。肝臓の PXR は胆汁酸代謝(12)、脂肪肝(13)に関与し、血管内皮では障害防御に(14)、小腸では免疫調節との関連が示唆されている(15)。また、PXR は糖脂質代謝を制御し、全身の代謝ホメオスタシスに影響することが示唆されている(16)。全身の PXR KO マウスでは、高脂肪食による肥満、脂肪肝、インスリン抵抗性が軽減されるといった報告がある(17)。またヒトにおいては、PXR アゴニストであるリファンピシンの内服が高血糖を誘導するとの報告がある(18)。腎臓内には十分な発現量の PXR が存在する(10, 11)にも関わらず、腎臓内での PXR の分布や機能に関しては未だ報告が無い(図イ)。そこで、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、次に腎臓内 PXR の糖尿病における

役割について検討した。この結果から、腎臓 PXR のエピジェネティクスによる調節と、糖尿病性腎症の進展について考察を行った。

第2章 方法

第1節 使用動物

動物の取り扱いに関しては防衛医科大学校および共同研究先の東京大学の定める動物倫理規定に準拠して行った。12時間サイクルの明暗で管理された環境内で、餌・飲水は自由に摂取させた。正常マウスとして C57B6/J マウス 8週齢雄を用いた。

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、対照コントロールとして *db/m* (ヘテロ) マウス 8週齢雄を用いた。

PXR 刺激実験においては、PXR アゴニストである Pregnane-16 α -Carbonitrile を DMSO に溶解して (100mg/kg 体重/回)、1日1回連続2日間腹腔内投与してその翌日に腎臓を摘出して解析した。

第2節 細胞ソーティング

近位尿細管細胞に特異的に結合する Lotus tetragonolobus lectin (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を使用した。このレクチンを Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識したものを、全腎をホモゲナイズして得られた腎細胞と混和し、FITC 信号強度の差をもとに FACS Aria III (BD Biosciences, San Jose, CA) で近位尿細管細胞とその他の腎細胞に分離した (図ウ)。

第3節 定量ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR)

High-capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems)を用いてcDNAを作成した。Pxr (mouse), PXR (human), β actin, 18S ribosomal RNA, GAPDHはTaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)を使用し、その他の遺伝子発現の定量にはプライマーを作成 (表1参照) してSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用いて定量した。ハウスキーピング遺伝子として、ソートされたマウス腎細胞には β actinを、マウス全腎細胞には18S ribosomal RNAを、HK2細胞にはGAPDHを用いて $\Delta\Delta$ CT法で解析した。

第4節 Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)法

DNAメチル化定量はCombined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)法を用いた。

EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Irvine, CA)を用いて、150ngから500ngのgenomic DNAのBisulfite conversionを行った。メチル化変化が想定されるDNA領域を含むように、MethPrimer(19)でprimerを作成 (表1参照) し、Immolase DNA Polymerase (Bioline, London, UK)を用いてPCRで増幅した。PCR増幅条件は、95 °C 7分の後、94 °C 1分、55 °C~60 °C 30秒、72 °C 1分を43サイクル行い、最後に72 °C 10分である。PCR産物を、ACGT配列を特異的に切断する酵素HpyCH4IVで処理しMultiNA microchip electrophoresis system (Shimadzu, Kyoto, Japan)で解析した (図エ)。

第5節 クロマチン免疫沈降法 (Chromatin Immunoprecipitation: ChIP)

ヒストン修飾定量にクロマチン免疫沈降法を用いた。

*db/db*および*db/m*マウスの全腎からDNAを抽出した。Protein A agarose / Salmon Sperm DNA (50% slurry) (Merck, Germany)および抗H3K9ac抗体 (#9671; Cell Signaling Technology, Beverly, MA)、抗H3K4me3抗体 (07-473; EMD Millipore, Bedford, MA)を用いてそれぞれの目的修飾ヒストンを結合しているDNAと共に免疫沈降させた。*Pxr*プロモータ領域を増幅するプライマーを作成し(表1参照)、免疫沈降DNAをqRT-PCRで定量した。

第6節 培養細胞

ヒト近位尿細管培養細胞であるHK2細胞 (Lonza, Walkersville, MD)を用いた。培養液はDMEM/F12 (Gibco)に10%FBSを加えたものを使用し、37°C、5%CO₂の環境下で培養した。4-7継代した細胞を用いた。脱メチル化の遺伝子発現への影響を調べるため、DNA脱メチル化薬5-Aza-2'-deoxycytidine (Wako, Osaka, Japan) 100nMを96時間作用させた。*PXR* agonistとして、Rifampicin (Wako, Osaka, Japan)を48時間作用させた。いずれも溶媒はDMSOを使用した。

第7節 small interfering RNA (siRNA)による*PXR*ノックダウン

PXR Stealth RNAi (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いた*PXR*ノックダウンを行った。コントロールにはStealth RNAi negative control duplex (low GC

duplex; Invitrogen)を用いた。*PXR* Stealth RNAiの配列：

5'-CCUUUGACACUACCUUCUCCCAUUU-3' (sense)

5'-AAAUGGGAGAAGGUAGUGUCAAGG-3' (antisense)

Lipofectamine RNAiMAX reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて siRNAを細胞にトランスフェクトさせた24時間後、10 μ M rifampicin (溶媒 DMSO) を投与して48時間後に回収した。

第8節 統計解析

2群間の比較はt検定を用いて、P valueが0.05未満のものを有意と判断した。3群以上の比較はANOVAを用いて、post hocテストにTukey-Kramerテストを行った。

第3章 結果

第1節 腎臓内 PXR の発現およびエピジェネティクス制御と、*db/db* マウスでのそれらの変化

第1項 マウス正常腎組織での PXR 発現およびエピジェネティクス情報

まず初めに、マウス正常腎組織において PXR がどの細胞で発現しているかを調べた。マウスの正常腎組織を Lotus tetragonolobous lectin を用いて、セルソーターで近位尿細管細胞とその他腎組織細胞に分離し、それぞれの細胞における *Pxr* mRNA 発現量を qRT-PCR で比較した。腎臓内の *Pxr* mRNA 発現は近位尿細管細胞にそのほとんどが局在していた(図1)。

次にそれぞれの細胞の *Pxr* DNA メチル化率について COBRA 法で検討した。

Pxr プロモータ領域近傍に存在する CpG 4 か所 (TSS -1015bp、-293bp、+1633bp、+1813bp) の DNA メチル化率について、近位尿細管細胞とその他の腎組織細胞を比較すると、近位尿細管細胞のメチル化率はすべての CpG 領域で有意に低値であった (図2)。

DNA 脱メチル化は下流遺伝子の発現亢進型の変化であり、mRNA 発現亢進に矛盾しない結果であった。

第2項 *db/db* マウスでの PXR 発現とエピジェネティクス情報の変化

次に、2型糖尿病モデルマウスである *db/db* マウスを用いて、*Pxr* mRNA 発現および *Pxr* DNA メチル化率の変化について検討した。

2型糖尿病モデルマウスである *db/db* マウス、およびコントロール (*db/m*) マウスの腎組織からセルソーターで近位尿細管細胞を単離し、*Pxr* mRNA 発現量を qRT-PCR で比較した。*db/db* マウス近位尿細管細胞の *Pxr* mRNA 発現量は、*db/m* マウスに比較して有意に多かった (図 3)。

db/db マウスにおける *Pxr* mRNA 発現量増加にエピジェネティクス制御が関与するか検討するため、まずそれぞれのマウスの近位尿細管における *Pxr* プロモータ領域近傍の DNA メチル化率を比較した。*db/db* マウス近位尿細管の *Pxr* DNA メチル化率は、TSS から 1000bp 以上下流に *db/m* マウス近位尿細管と比較し有意に低値である部位を認めた (図 4)。TSS 近傍も脱メチル化が *db/db* マウスで亢進している可能性はあるが、TSS 近傍はコントロールマウスの近位尿細管ですでにほとんど脱メチル化しているため、有意な差を検出出来なかった。脱メチル化は下流遺伝子の発現亢進型の変化であるため、*db/db* マウス近位尿細管における *Pxr* mRNA 発現増加と矛盾しない結果であった。

次に、DNA メチル化と並んでエピジェネティクス情報として重要なヒストン修飾について検討した。*Pxr* DNA プロモータ領域 (TSS-189~335bp) の DNA とヌクレオソームを形成するヒストンを対象に、発現を亢進させるヒストン修飾である H3K9ac (ヒストン 3 の N 末端から 9 番目のリジンアセチル化) および H3K4me3 (ヒストン 3 の N 末端から 4 番目のリジントリメチル化) の量を、ChIP 法を用いて計量したところ、いずれのヒストン修飾も *db/db* マウス近位尿細管細胞において *db/m* マウス近位尿細管細胞と比較して有意に多かった (図 5 A, B)。

以上の結果から、*Pxr* DNA メチル化および *Pxr* プロモータ領域のヒストン修飾ともに、*Pxr* mRNA 発現の亢進と矛盾しないエピジェネティクス変化を示すことができた。

第3項 エピジェネティクス情報変化がもたらす *PXR* mRNA 発現の変化

これまでの結果から、mRNA 発現変化とエピジェネティクス情報変化の関連が示された。次に、腎 *PXR* の mRNA 発現が、エピジェネティクス情報の変化によって変化するのか、ヒト培養近位尿細管細胞を用いて検討した。HK2 細胞に DNA メチル化酵素阻害薬 5-Aza-2'-deoxycytidine(5-Aza)を投与し、*PXR* DNA を脱メチル化させると (図6)、*PXR* mRNA 発現は亢進した (図7)。

第4項 小括

以上の結果から、近位尿細管の *PXR* 発現はエピジェネティクスによって制御され、糖尿病ではエピジェネティクスが発現亢進型変化により近位尿細管の *PXR* 発現が増加していると考えられた。

第2節 腎臓内 *PXR* の糖尿病における役割

第1項 *PXR* アゴニストと糖尿病による、*Slco2B1*、*Rgc32*、*Pck1* 遺伝子の発現増加

前節で、腎臓内 *PXR* が糖尿病によってエピジェネティクス異常を伴って増加することを示した。本節では、この腎臓内 *PXR* がどのような役割を持っているのかを検討した。

これまで肝臓内 *PXR* によって制御されることが報告されている遺伝子や、糖尿病発症・進展に関与し得る遺伝子などを、できる限り広範囲に検索し、次に

示す 3 遺伝子に注目した。

db/m マウスに PXR アゴニスト (Pregnane-16 α -carbonitrile: PCN)を投与すると、腎臓内で薬物代謝トランスポータ遺伝子の一つである *Slco2b1* (図 8 A)、線維化遺伝子 *Rgc32* (図 8 B)、糖新生酵素遺伝子 *Pck1* (図 8 C) の mRNA 発現が有意に増加した。

薬物代謝遺伝子群は、PXR が発現を制御する代表的な遺伝子で、*Slco2b1* を含むトランスポータ群は肝 PXR で制御されることがすでに報告されている(20)が、*Slco2B1* はその中では必ずしも代表的な遺伝子ではなく、腎臓での発現・役割も未知であるため注目した。

Rgc32 は、これまで PXR との関連を示唆する報告は無く、機能もまだ不明な点が多い遺伝子であるが、マイクロアレイを用いた予備検討でその変化が示唆された遺伝子の一つであった。

Pck1 は、糖新生で重要な役割を果たす酵素の遺伝子で、近位尿細管細胞に豊富に存在する(24)ため、糖尿病性腎症の発症機序を考えるうえで重要と考え注目した。

糖尿病モデルマウスの *db/db* マウスにおいても、*db/m* マウスと比較して、これら 3 遺伝子の腎臓内発現は有意に多かった (図 9 A, B,C)。

第 2 項 3 遺伝子と PXR の関連性の検討

次に、PXR アゴニスト投与および *db/db* マウスで発現増加を認めた 3 遺伝子の変化が、PXR の直接作用によるものかを検討するため、ヒト近位尿細管培養細胞である HK2 細胞にヒト PXR アゴニストである Rifampicin 投与時の 3 遺伝子 (*Slco2B1*、*Rgc32*、*Pck1*) 発現の変化を検討した。

PXR は、マウスとヒトでリガンド結合領域に種差があり、マウス PXR アゴニストである PCN はヒト PXR に対する作用が弱い。そのため、マウスとヒトで異なる PXR アゴニストを使用した。Rifampicin の投与で、これら 3 遺伝子の発現は濃度依存性に増加した (図 10 A, B, C)。

最後に、HK2 細胞の *PXR* をノックダウンし、これら 3 遺伝子の発現ならびにアゴニスト投与による発現亢進がどのように変化するか検討した。

siRNA を用いた *PXR* ノックダウンによる *PXR* mRNA 発現変化を示す (図 11)。 *PXR* は、siRNA によって 20%程度まで発現が抑制された。 *PXR* ノックダウンによる 3 遺伝子の発現変化を示す (図 12 A, B, C)。

RGC32、*PCK1* は、*PXR* の発現抑制に伴い有意に発現が抑制された。*SLCO2B1* でも抑制傾向がみられた。Rifampicin による発現増加は、*PXR* ノックダウンによって 3 遺伝子いずれも有意に抑制された。ただし、*RGC32* の発現変化は他 2 遺伝子と比較すると抑制が限定的であり、*PXR* 以外の制御が関与している可能性が考えられた。

第 3 項 小括

以上の結果から、ヒト腎臓内 PXR は、*SLCO2B1*、*RGC32*、*PCK1* の発現を制御し、糖尿病においてそれらの遺伝子発現を亢進させることが示唆された。

第4章 考察

この研究では、近位尿細管に局在する PXR が、糖尿病動物モデル、*db/db* マウスの腎臓でエピジェネティクス変化を伴い発現が増加することを初めて示した。また、*db/db* マウスにおいて PXR の発現変化が、糖尿病悪化に関与し得る糖新生遺伝子 (*Pck1*) の発現を亢進させること、および他臓器では一般的に PXR の代表的な制御遺伝子として認知されていない線維化 (*Rgc32*) や薬物代謝遺伝子 (*Slco2b1*) に関与する遺伝子の発現が PXR の発現増加に伴い増加することを明らかにした。

近年、エピジェネティクスの異常が持続的に形質異常を維持し、メタボリックメモリーの機序に関与していることが想定されている(8)。特に DNA メチル化は比較的安定なエピジェネティクス情報であり(21)、先行研究においても DNA メチル化異常が糖尿病治療に抵抗性であった(9)ことを踏まえると、今後、糖尿病性腎症におけるエピジェネティクス異常を伴った遺伝子について研究することが、糖尿病発症・進展機序の解明につながると考えられた。

先行研究で報告したアンジオテンシノーゲンや hepatocyte growth factor receptor といった遺伝子に加え(9)、この研究では PXR が腎臓では近位尿細管に主に発現しており、糖尿病マウスにおいてエピジェネティクス異常を伴い発現が増加することを示した。また、培養細胞において 5Aza による DNA メチル化阻害の際にも同様の PXR の発現増加を認めた。これらから、エピジェネティクス制御によって近位尿細管細胞に PXR が発現し、糖尿病の近位尿細管細胞ではエピジェネティクス情報が変化し PXR の発現が増加していることが示唆された。

PXR は、1998 年に薬物代謝遺伝子を制御する核内受容体であることが初めて報告された(22)。肝臓が最も PXR の発現が多い臓器であるが、腎臓にも比肩する量の PXR が存在する(11)。これまで、PXR の糖代謝関連を含めた様々な機能

が報告され(21)、腎での特異的な発現に関しても報告されているにも関わらず(10, 23)、腎臓に限局した PXR の機能を検討した報告はなかった。PXR は以前から薬物代謝酵素を制御する核内受容体として報告されていた(10, 15)。しかし、肝臓 PXR で制御される代表的な薬物代謝酵素は腎臓ではほとんど発現しておらず、腎臓 PXR は肝臓 PXR と異なる機能を持つ可能性が想定された。

本研究において、腎臓内の PXR が、SLCO2B1、RGC32、PCK1 の 3 遺伝子を制御することを初めて示した。これらの遺伝子は *in vivo* および *in vitro* 共に PXR アゴニスト刺激によって mRNA 発現が亢進するだけでなく、PXR 発現が増加している糖尿病腎においても発現の亢進が認められた。この結果は糖尿病腎において、エピジェネティクス異常によって持続的に発現が亢進した PXR が、これらの遺伝子発現を刺激していることを示唆するものであった。

PXR は、生体異物を感知し、臓器特異的に cytochromeP450 酵素群や ABC transporter、organic anion transporting polypeptide family を含むトランスポータ群の発現を制御する(24, 25)。PXR はマウス肝臓においては *Cyp3a11* の発現(26)を、ヒト肝臓においては *CYP3A4* (27)の発現調節を行っていることが報告されたが、腎臓では肝臓と比較するとこれらの遺伝子発現は少ない。本研究によって、腎 PXR が臓器特異的に制御する薬物代謝遺伝子の一つとして *SLCO2B1* (Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 2B1) が示唆された。*SLCO2B1* は、膜輸送トランスポータの一種で、多くの内因性物質や、临床上重要な薬剤である HMG-CoA 還元酵素阻害薬の輸送に関与し、主に肝細胞の類洞側に発現していることが知られている(20) (図オ)。腎臓における *SLCO2B1* の役割は不明な点が多いが、PXR-*SLCO2B1* 経路が、腎臓において生体異物感知・輸送の役割を果たしている可能性が考えられる。興味深いことに、骨格筋における *SLCO2B1* の発現増加が、HMG-CoA 還元酵素阻害薬の細

胞内濃度を増加させ、HMG-CoA 還元酵素阻害薬誘導性ミオパチーに關与する可能性が報告されている(28)。HMG-CoA 還元酵素阻害薬による腎障害(29)を含めた、HMG-CoA 還元酵素阻害薬の薬物代謝動態に、腎臓内の PXR-SLCO2B1 経路が果たす役割について、今後のさらなる研究が必要である。

RGC32 (Response gene to complement 32)は、Transforming Growth Factor β と關連して、腎線維化に關与する遺伝子として報告された(30, 31)。また興味深いことに、*Rgc32* 発現低下によって脂肪細胞燃焼が誘導されることから、*Rgc32*が肥満やインスリン抵抗性に關与する可能性が報告されている(23)。これまで、PXR と *RGC32*の關連についての報告は無く、本研究において初めて PXR による *RGC32*の発現制御の可能性が示唆された。これまでの報告から、糖尿病腎における PXR 増加に伴う *RGC32*の発現増加が、腎線維化やインスリン抵抗性増悪に關与する可能性が考えられる。例えば、糖尿病性腎症早期においては、*RGC32*がインスリン抵抗性に關与し、糖尿病性腎症が進行するに従って、腎線維化に關与するといった可能性などが想定され、*RGC32*の糖尿病性腎症での役割について今後の研究が待たれる。

PCK1 は、オキサロ酢酸をホスホエノールピルビン酸に変換するホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼをコードする遺伝子で、糖新生に關与し(32)、肝臓及び近位尿細管に豊富に発現している (図カ)。腎臓内での糖新生は近位尿細管で主に行われ、インスリンやカテコラミンで制御されている。2型糖尿病患者では、肝臓および腎臓での糖新生が亢進しており、腎臓内での糖新生の亢進比率は肝臓での亢進比率を大きく上回り、3 倍程度まで上昇するとの報告がある(33)。健常人では腎臓内の糖新生が全身に及ぼす影響は軽微なものだが、糖尿病患者においては、糖新生が腎へのグリコーゲン蓄積を介して腎障害に關与する可能性がある(34)。肝臓内 PXR による *PCK1* 制御についてはすでに報告がある

が、種差が指摘されている。ヒト肝臓では、PXR が Serum and glucocorticoid-regulated kinase2 (SGK2) を介して *G6PC* (Glucose-6-phosphataseをコードする遺伝子)などの糖新生遺伝子発現を亢進させる(35)。一方、マウスの肝臓では糖新生酵素発現は SGK2 に非依存性であり、*Pck1* 発現を誘導する CREB などの転写因子を PXR が抑制し、糖新生を抑制するという報告がある(36)。しかし本研究においては、腎臓の PXR 発現がヒト・マウス共に糖新生を亢進させることが示唆された。腎臓での PXR 発現は、糖新生に関して種に関わらず糖新生亢進に関与する可能性が考えられる。マウス腎臓には SGK2 が高発現していることが報告されており(37)、SGK2 依存性経路がヒト・マウス両方の腎臓において機能しているかもしれない。本研究の結果からはマウス・ヒトでともに糖尿病状態では腎臓内の糖新生が PXR を介して亢進し、糖尿病増悪に関与する可能性が示唆された。

興味深いことに、PXR アゴニストの Rifampicin が高血糖を誘導するという報告に加え(18)、HMG-CoA 還元酵素阻害薬は、内服により糖尿病リスクが増大するという報告がある(38, 39)。アトルバスタチンなどの HMG-CoA 還元酵素阻害薬は PXR のアゴニストになると報告されており(40)、HMG-CoA 還元酵素阻害薬による血糖上昇には、腎 PXR が関与している可能性も考えられた。

腎臓 PXR が制御する遺伝子については、まだ未解明な点が多い。PXR が抑制された場合の遺伝子発現の動向についての検討は十分に行われていない。PXR は異物感知受容体として様々な物質をアゴニストとして認識するが、特異的なアンタゴニストについては不明である。PXR アンタゴニストとしてよく用いられる薬剤として ketoconazole が挙げられる(41) が、特異性が低い。PXR 抑制の生体への影響を検討するには、今後 PXR ノックアウトマウスを用いる必要があると考えられた。また、PXR がそれぞれの遺伝子を制御する機序につい

ても、今後更に検討すべき点である。核内受容体である PXR は、SGK2 などの因子と複合体を形成し、直接 DNA 上のレスポンスエレメントに結合して発現制御を行う(27)ことが一般的に想定されているが、マウス肝臓における PXR の糖新生遺伝子制御の際には、DNA 上に直接的に結合するのは FOXO1(42)、CREB(36)などの転写因子で、活性化された PXR は、これらの転写因子を不活性化することによって糖新生遺伝子の発現を抑制するという報告もある。今回の研究で PXR による制御が示唆された 3 遺伝子はすべて PXR 活性化に伴い発現が亢進するため、おそらく SGK2 等の関与を経て、PXR 複合体が直接 DNA プロモータ領域に結合し転写開始に関与すると予想されるが、あるいは直接的に結合するのはその他の転写因子で、PXR が補助的に関与している可能性も考えられる。腎 PXR の遺伝子制御機構については更なる検討が必要である。

今後、糖尿病性腎症における PXR とエピジェネティクスの関係および PXR の機能について検討することが、糖尿病性腎症の新たな病態解明と治療探索に有用である可能性が示唆された。

第5章 総括

腎臓内 PXR は、エピジェネティクスにより制御され、近位尿細管に主に発現している。糖尿病腎では、PXR はエピジェネティクス変化を伴って発現が亢進し、薬物代謝、線維化、糖新生関連遺伝子の発現を亢進させた。

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。

謝辞

本研究において、ご指導いただいた防衛医科大学校腎臓内分泌内科教授 熊谷裕生先生、同校循環器内科教授 足立健先生、同校薬理学教授 石塚俊晶先生、ならびに、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教授 藤田敏郎先生、同講座准教授 丸茂丈史先生、同講座研究員 河原崎和歌子先生、西本光宏先生、鮎澤信宏先生、広浜大五郎先生、上田浩平先生に感謝申し上げます。

引用文献

1. Gregg EW, Li Y, Wang J, Burrows NR, Ali MK, Rolka D, et al. Changes in diabetes-related complications in the United States, 1990-2010. *N Engl J Med.* 2014;370(16):1514-23.
2. Diabetes C, Complications Trial Research G, Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993;329(14):977-86.
3. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008;359(15):1577-89.
4. Writing Team for the Diabetes C, Complications Trial/Epidemiology of Diabetes I, Complications Research G. Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study. *JAMA.* 2003;290(16):2159-67.
5. Pirola L, Balcerczyk A, Okabe J, El-Osta A. Epigenetic phenomena linked to diabetic complications. *Nat Rev Endocrinol.* 2010;6(12):665-75.
6. Marx V. Epigenetics: Reading the second genomic code. *Nature.* 2012;491(7422):143-7.
7. Kikuchi R, Yagi S, Kusuhara H, Imai S, Sugiyama Y, Shiota K. Genome-wide analysis of epigenetic signatures for kidney-specific

- transporters. *Kidney Int.* 2010;78(6):569-77.
8. Reddy MA, Natarajan R. Recent developments in epigenetics of acute and chronic kidney diseases. *Kidney Int.* 2015;88(2):250-61.
 9. Marumo T, Yagi S, Kawarazaki W, Nishimoto M, Ayuzawa N, Watanabe A, et al. Diabetes induces aberrant DNA methylation in the proximal tubules of the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26:2388-97.
 10. Kliewer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, et al. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell.* 1998;92(1):73-82.
 11. Miki Y, Suzuki T, Tazawa C, Blumberg B, Sasano H. Steroid and xenobiotic receptor (SXR), cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance gene 1 in human adult and fetal tissues. *Mol Cell Endocrinol.* 2005;231(1-2):75-85.
 12. Xie W, Radominska-Pandya A, Shi Y, Simon CM, Nelson MC, Ong ES, et al. An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(6):3375-80.
 13. Zhou J, Febbraio M, Wada T, Zhai Y, Kuruba R, He J, et al. Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis. *Gastroenterology.* 2008;134(2):556-67.
 14. Wang X, Fang X, Zhou J, Chen Z, Zhao B, Xiao L, et al. Shear stress activation of nuclear receptor PXR in endothelial detoxification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(32):13174-9.
 15. Venkatesh M, Mukherjee S, Wang H, Li H, Sun K, Benechet AP, et al.

- Symbiotic bacterial metabolites regulate gastrointestinal barrier function via the xenobiotic sensor PXR and Toll-like receptor 4. *Immunity*. 2014;41(2):296-310.
16. Hakkola J, Rysa J, Hukkanen J. Regulation of hepatic energy metabolism by the nuclear receptor PXR. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1859(9):1072-82.
 17. He J, Gao J, Xu M, Ren S, Stefanovic-Racic M, O'Doherty RM, et al. PXR ablation alleviates diet-induced and genetic obesity and insulin resistance in mice. *Diabetes*. 2013;62(6):1876-87.
 18. Rysa J, Buler M, Savolainen MJ, Ruskoaho H, Hakkola J, Hukkanen J. Pregnane X receptor agonists impair postprandial glucose tolerance. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;93(6):556-63.
 19. Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*. 2002;18(11):1427-31.
 20. Kalliokoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol*. 2009;158(3):693-705.
 21. Bintu L, Yong J, Antebi YE, McCue K, Kazuki Y, Uno N, et al. Dynamics of epigenetic regulation at the single-cell level. *Science*. 2016;351(6274):720-4.
 22. Synold TW, Dussault I, Forman BM. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med*. 2001;7(5):584-90.
 23. Cui XB, Luan JN, Ye J, Chen SY. RGC32 deficiency protects against high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *J*

- Endocrinol. 2015;224(2):127-37.
24. Ihunnah CA, Jiang M, Xie W. Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812(8):956-63.
 25. Zhou C. Novel functions of PXR in cardiometabolic disease. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1859(9):1112-20.
 26. Ripp SL, Fitzpatrick JL, Peters JM, Prough RA. Induction of CYP3A expression by dehydroepiandrosterone: involvement of the pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(5):570-5.
 27. Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Kliewer SA. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest.* 1998;102(5):1016-23.
 28. Knauer MJ, Urquhart BL, Meyer zu Schwabedissen HE, Schwarz UI, Lemke CJ, Leake BF, et al. Human skeletal muscle drug transporters determine local exposure and toxicity of statins. *Circ Res.* 2010;106(2):297-306.
 29. Dormuth CR, Hemmelgarn BR, Paterson JM, James MT, Teare GF, Raymond CB, et al. Use of high potency statins and rates of admission for acute kidney injury: multicenter, retrospective observational analysis of administrative databases. *BMJ.* 2013;346:f880.
 30. Li F, Luo Z, Huang W, Lu Q, Wilcox CS, Jose PA, et al. Response gene to complement 32, a novel regulator for transforming growth factor-beta-induced smooth muscle differentiation of neural crest cells.

- J Biol Chem. 2007;282(14):10133-7.
31. Li Z, Xie WB, Escano CS, Asico LD, Xie Q, Jose PA, et al. Response gene to complement 32 is essential for fibroblast activation in renal fibrosis. J Biol Chem. 2011;286(48):41323-30.
 32. Beale EG, Harvey BJ, Forest C. PCK1 and PCK2 as candidate diabetes and obesity genes. Cell Biochem Biophys. 2007;48(2-3):89-95.
 33. Meyer C, Stumvoll M, Nadkarni V, Dostou J, Mitrakou A, Gerich J. Abnormal renal and hepatic glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus. J Clin Invest. 1998;102(3):619-24.
 34. Wilding JP. The role of the kidneys in glucose homeostasis in type 2 diabetes: clinical implications and therapeutic significance through sodium glucose co-transporter 2 inhibitors. Metabolism. 2014;63(10):1228-37.
 35. Gotoh S, Negishi M. Serum- and glucocorticoid-regulated kinase 2 determines drug-activated pregnane X receptor to induce gluconeogenesis in human liver cells. J Pharmacol Exp Ther. 2014;348(1):131-40.
 36. Kodama S, Moore R, Yamamoto Y, Negishi M. Human nuclear pregnane X receptor cross-talk with CREB to repress cAMP activation of the glucose-6-phosphatase gene. Biochem J. 2007;407(3):373-81.
 37. Pao AC, Bhargava A, Di Sole F, Quigley R, Shao X, Wang J, et al. Expression and role of serum and glucocorticoid-regulated kinase 2 in the regulation of Na⁺/H⁺ exchanger 3 in the mammalian kidney. Am J Physiol Renal Physiol. 2010;299(6):F1496-506.

38. Sattar N, Preiss D, Murray HM, Welsh P, Buckley BM, de Craen AJ, et al. Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials. *Lancet*. 2010;375(9716):735-42.
39. Preiss D, Sattar N. Statins and the risk of new-onset diabetes: a review of recent evidence. *Curr Opin Lipidol*. 2011;22(6):460-6.
40. Howe K, Sanat F, Thumser AE, Coleman T, Plant N. The statin class of HMG-CoA reductase inhibitors demonstrate differential activation of the nuclear receptors PXR, CAR and FXR, as well as their downstream target genes. *Xenobiotica*. 2011;41(7):519-29.
41. Huang H, Wang H, Sinz M, Zoeckler M, Staudinger J, Redinbo MR, et al. Inhibition of drug metabolism by blocking the activation of nuclear receptors by ketoconazole. *Oncogene*. 2007;26(2):258-68.
42. Kodama S, Koike C, Negishi M, Yamamoto Y. Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes. *Mol Cell Biol*. 2004;24(18):7931-40.

図表

表 本研究で使したオリゴヌクレオチド一覧

Name		Primer sequence (5' to 3')
<i>Slco2b1</i>	Forward	agcctcatgctacgccttta
	Reverse	ggaccaccagtcctgaagag
<i>Rgc32</i>	Forward	ctccaaccaactcctctcca
	Reverse	gtccagatcggcaatgaagt
<i>Pck1</i>	Forward	aggagtacgggcagttgct
	Reverse	tctgctcttgggtgatgatg

Primers used for real-time PCR (human)

Name		Primer sequence (5' to 3')
<i>SLCO2B1</i>	Forward	agggctctgcttagagggag
	Reverse	ggaaatgcccaaggaaaaac
<i>RGC32</i>	Forward	aagtgaatctgcactctccga
	Reverse	gccacttcactacgaggag
<i>PCK1</i>	Forward	aggcggctgaagaagtatga
	Reverse	ttgctcttgggtgacgataa

Primers for bisulfite PCR, COBRA (mouse)

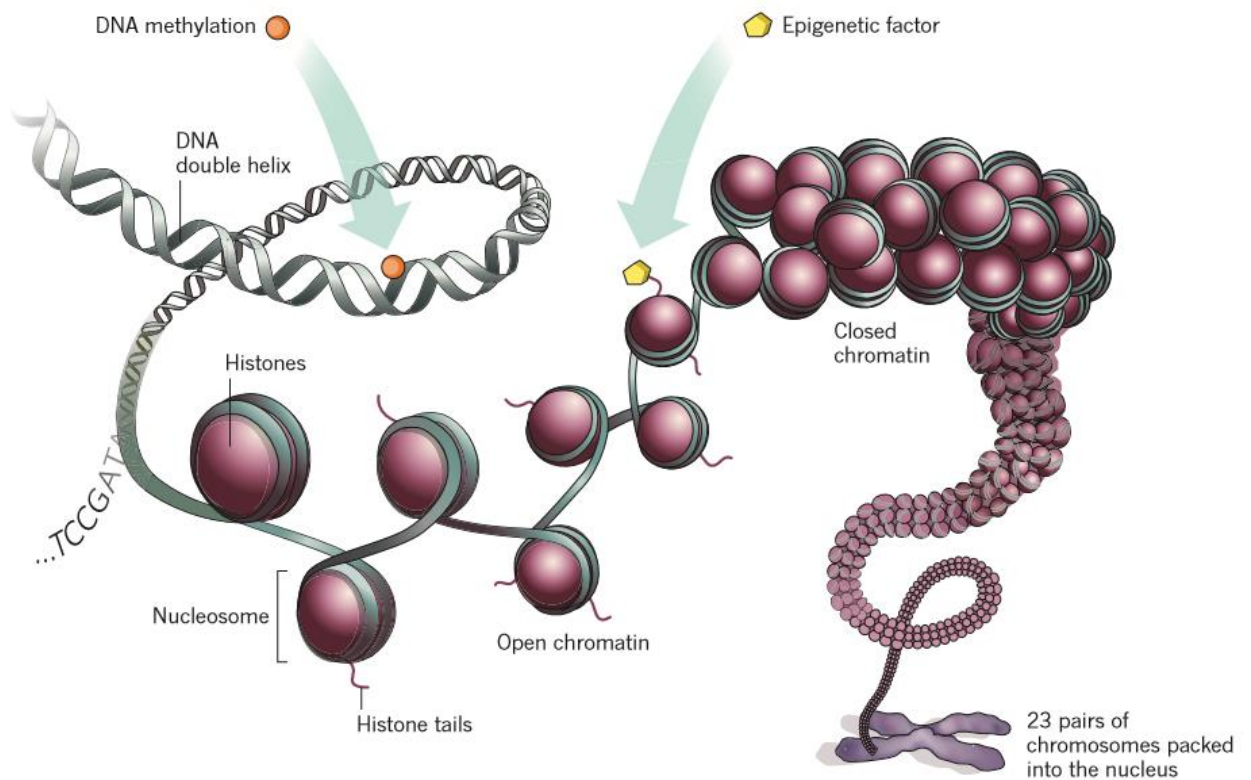
Name	Position(NCBI37/mm9)		Primer sequence (5' to 3')
<i>Pxr</i> TSS-1015bp	chr16:38295925-38295928	Forward	ggtaggattttagaatgggtagggat
		Reverse	aaaaatcaaaactccaatttctctc
<i>Pxr</i> TSS-293bp	chr16:38295202-38295205	Forward	tgtagtaaggggttttagttggtatt
		Reverse	atccaaccaactttctatcctataat
<i>Pxr</i> TSS+1633bp	chr16:38293277-38293280	Forward	agattggttttaggtggttattg
		Reverse	aaaaacctaactcctccctaaaa
<i>Pxr</i> TSS+1813bp	chr16:38293097-38293100	Forward	tttgaatttatatggtggaaggaga
		Reverse	tcccaccaaacaactaacataatata

Primers for bisulfite PCR, COBRA (human)

Name	Position(GRCh37/hg19)		Primer sequence (5' to 3')
<i>PXR</i> TSS-141bp	chr3:119499189-119499192	Forward	gggttgagagtgatttggttt
		Reverse	ccaactcaataaaccacctacca

Primers used for real-time PCR for ChIP

Name	Position(NCBI37/mm9)		Primer sequence (5' to 3')
<i>Pxr</i>	chr16:38295099-38295235 (TSS-189 to -335bp)	Forward	tgctctctgagggtgattt
		Reverse	tgcatgtgtgtggcctttt



図ア エピジェネティクスによる遺伝子発現制御機構

エピジェネティクスで特に研究されている機構として、DNAメチル化、ヒストン修飾がある。DNAの脱メチル化やヒストンアセチル化は、近接するDNAをオープンクロマチンにする機構に関与して近接遺伝子の発現を亢進させる一方、DNAメチル化やヒストンメチル化の一部は、反対に近接するDNAをクローズドクロマチンにする機構に関与し、近接遺伝子の発現を抑制する。

Marx V. et al. Epigenetics: Reading the second genomic code. Nature. 2012;491(7422):143-7. から引用

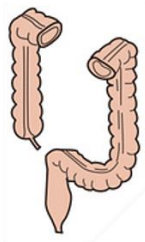


脂肪肝 *Gastroenterology 2008*
耐糖能異常 *Diabetes 2013*
糖新生 *JBC 2007*



動脈硬化
PNAS 2013

薬物代謝(抱合・輸送)
Cell 1998

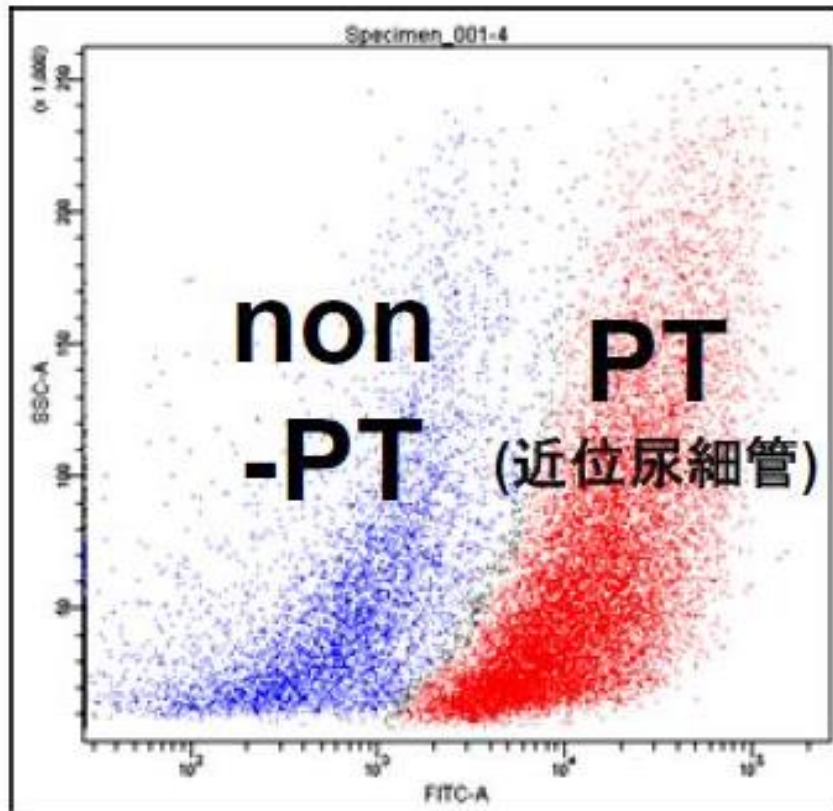


抗炎症
Immunity 2014



図イ これまでに報告されている PXR の機能・役割

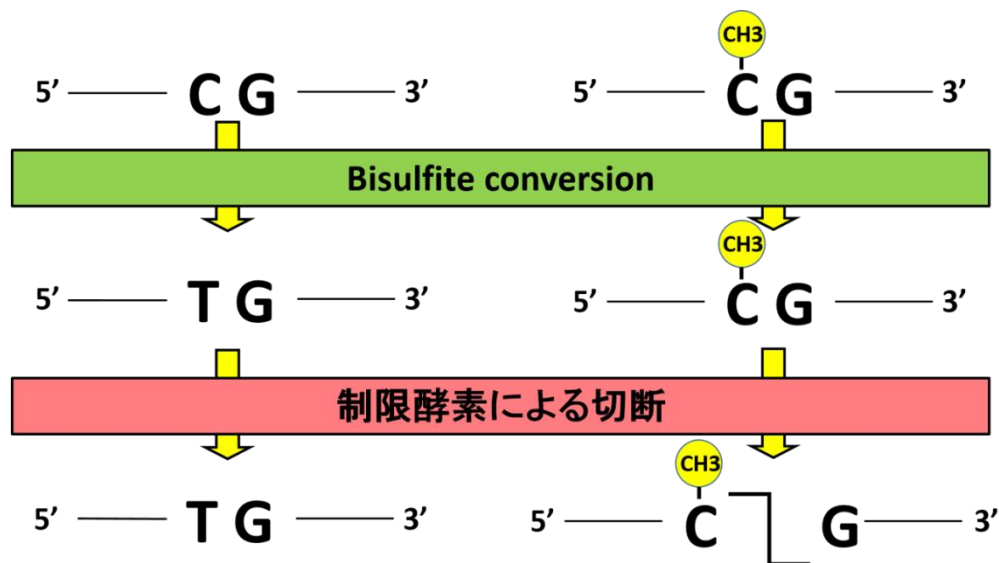
PXR は、薬物代謝に関与する受容体として初めてその役割が報告され、肝・小腸・腎に主に発現している。これまでの研究により、PXR は様々な役割を持っていることが報告された。しかし、腎臓における PXR の役割についての報告は未だ無い。



図ウ 近位尿細管ソーティング

Side Scatter(ソート対象物質の形状の複雑さを反映する)を縦軸、FITC 蛍光強度を横軸で示したもの。FITC 標識されたレクチンを多く結合する近位尿細管細胞 (PT)が右側 (赤色) に分布し、その他の細胞 (non-PT)が左側 (青色) に分布している。

Marumo T, Watanabe A, et al. Diabetes induces aberrant DNA methylation in the proximal tubules of the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26:2388-97.から引用改変

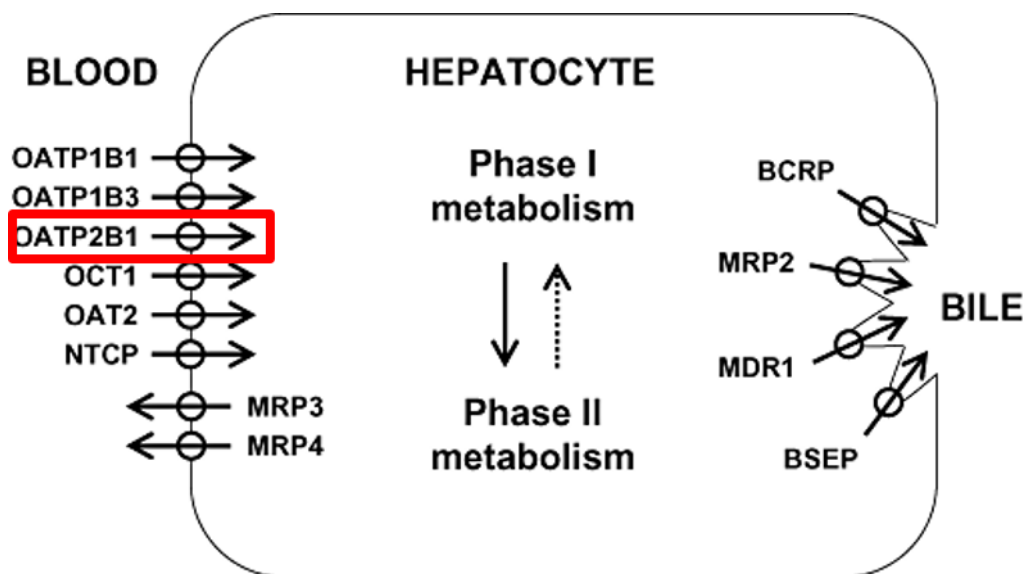


DNAサイズ毎の定量解析

DNAメチル化率を算出

図エ Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)法

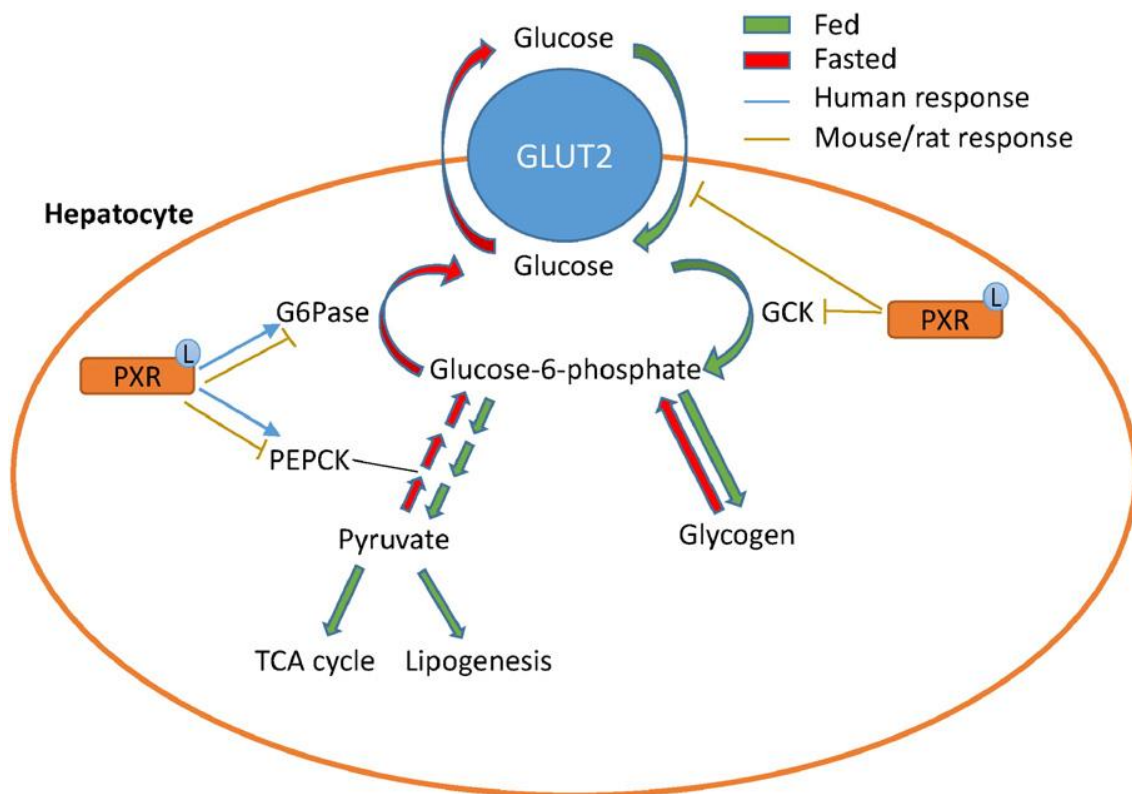
Bisulfite conversionでは、シトシンをチミンに変換するが、メチル化したシトシンは変化しない。Bisulfite conversion後、特定の塩基配列を切断する制限酵素を用いて、メチル化したDNAのみを切断し、生じたDNAをサイズ毎に定量することで、目的とする一か所のDNAメチル化率を算出できる。



図オ *SLCO2B1*の発現および機能

SLCO2B1 (Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 2B1。別名 *OATP2B1*; Organic Anion Transporting Polypeptides 2B1)は、膜輸送トランスポートの一種で、多くの内因性物質や、临床上重要な薬剤である *HMG-CoA*還元酵素阻害薬の輸送に関与し、ユビキタスに発現するが、主に肝細胞の類洞側に発現していることが知られている。

Kalliokoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol.* 2009;158(3):693-705. から引用改変



図カ *PCK1*の発現および機能

*PCK1*は、オキサロ酢酸をホスホエノールピルビン酸に変換するホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼをコードする遺伝子で、糖新生に関与し、肝臓及び近位尿細管に豊富に発現している。ヒト肝臓では、PXRが糖新生遺伝子発現を亢進させる一方、マウスの肝臓ではPXRは糖新生を抑制する。

Hakkola J, et al. Regulation of hepatic energy metabolism by the nuclear receptor PXR. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1859(9):1072-82. より引用

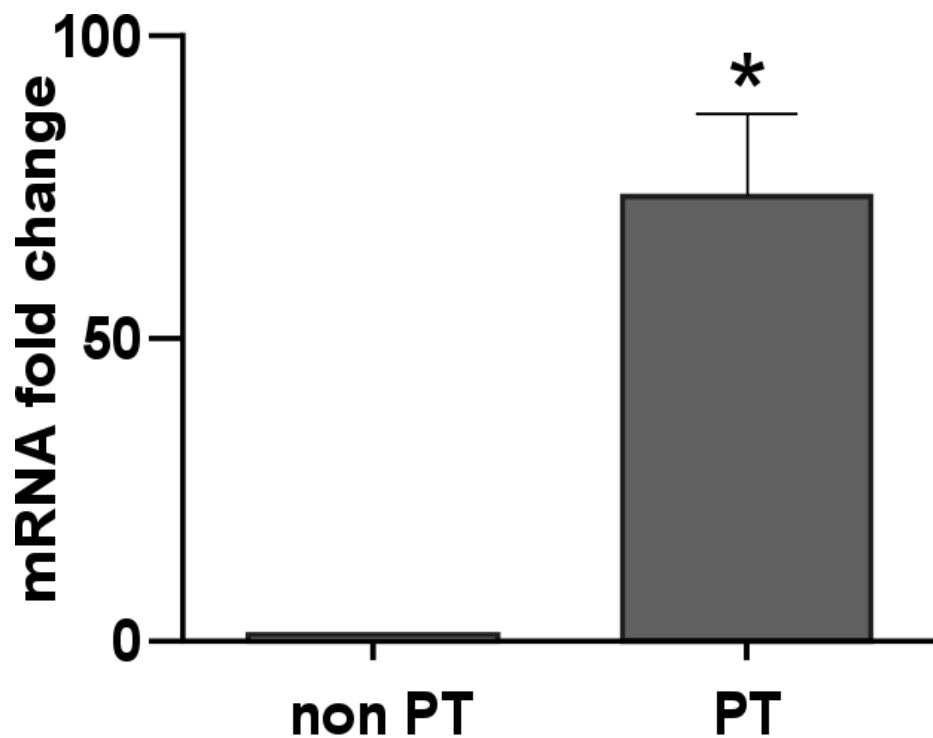


図1 正常マウス腎における *Pxr* mRNA 発現

マウスの正常腎組織をセルソーターで近位尿細管細胞 (PT) とその他腎組織細胞 (non PT) に分離し、それぞれの細胞での *Pxr* mRNA 発現量を qRT-PCR で比較した。*Pxr* mRNA は、腎臓内ではほとんどが近位尿細管に発現していた。

データは平均±標準誤差で示した。* $p < 0.05$ 対 non PT 群。サンプル数=各群 6。

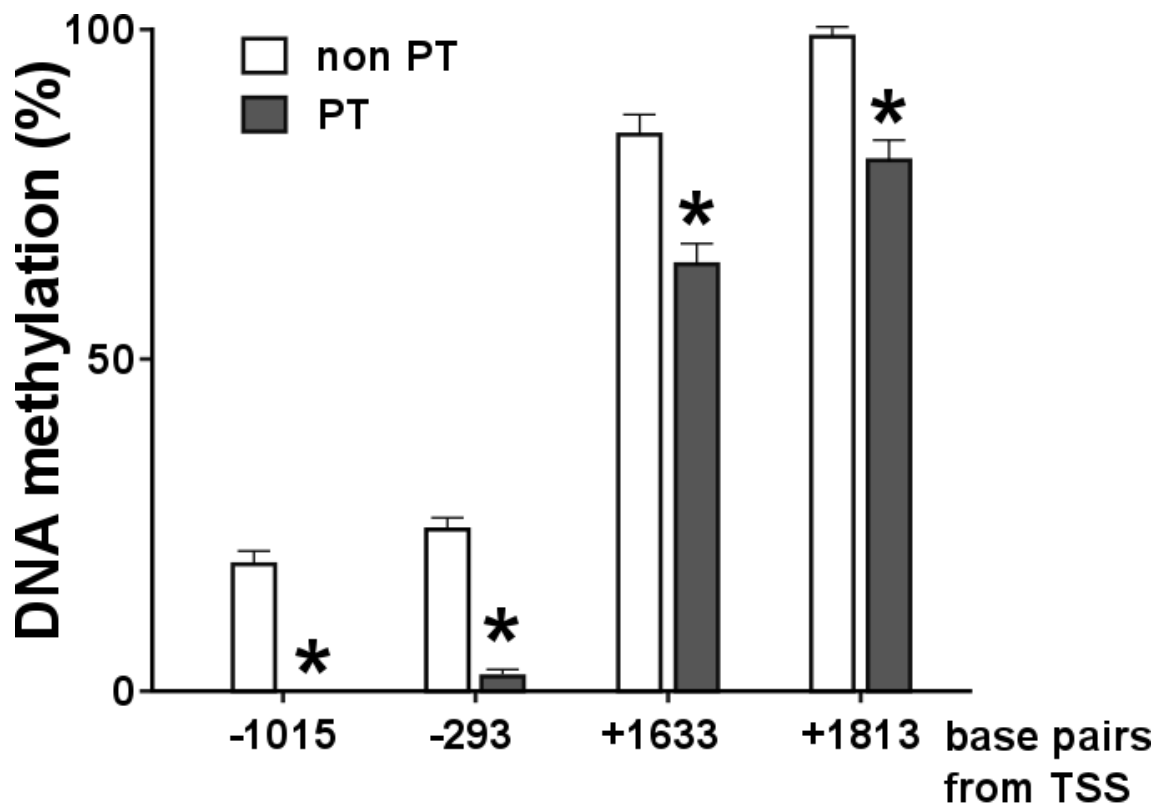


図2 正常マウス腎組織細胞における *Pxr* DNA メチル化率

マウスの正常腎組織をセルソーターで近位尿細管細胞 (PT) とその他腎組織細胞 (non PT) に分離し、それぞれの細胞での *Pxr* DNA メチル化率を COBRA 法で比較した。*Pxr* DNA メチル化率は、TSS 近傍の 4 か所の CpG を解析した。

non PT と比較すると、PT ではすべての CpG で有意に低値だった。データは平均±標準誤差で示した。* $p < 0.05$ 対 non PT 群。サンプル数=各群 6。

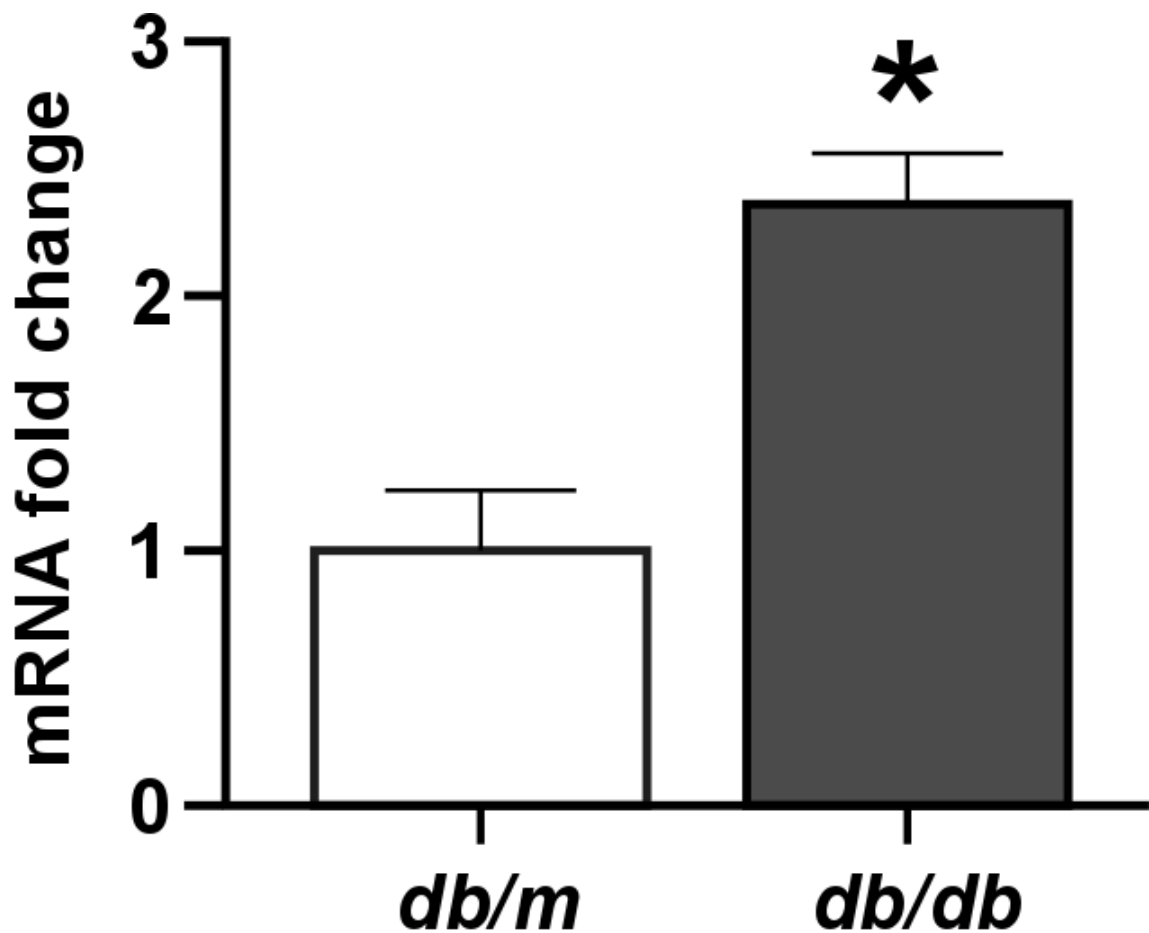


図3 *db/db* マウス (2 型糖尿病モデルマウス) 近位尿細管細胞における *Pxr* mRNA 変化

2 型糖尿病モデルマウスである *db/db* マウス、そのコントロールマウスである *db/m* マウスの腎組織から、セルソーターで近位尿細管細胞を単離し、*Pxr* mRNA 発現量を qRT-PCR で比較した。*db/db* マウス近位尿細管細胞の *Pxr* mRNA 発現量は、*db/m* マウス近位尿細管細胞に比較して有意に多かった。

データは平均±標準誤差で示した。* $p < 0.05$ 対 *db/m* マウス群。サンプル数=各群 4。

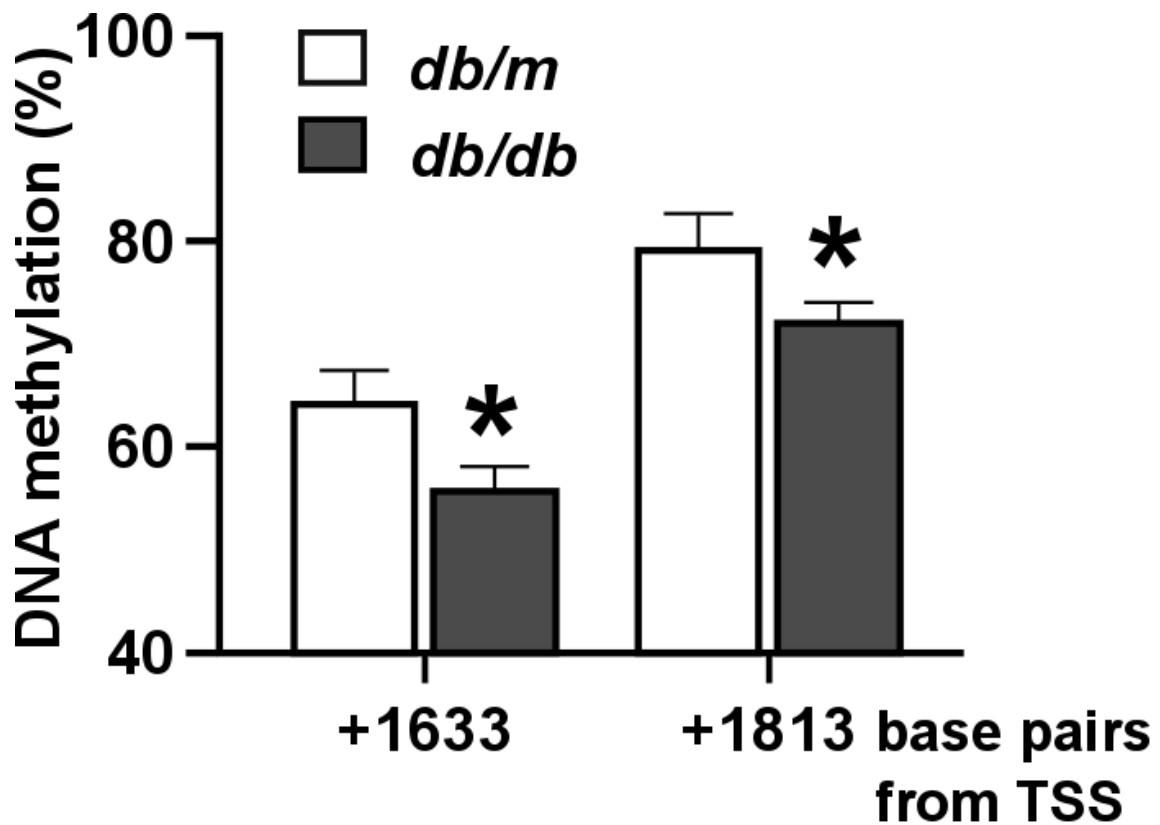


図4 *db/db* マウス近位尿細管細胞における *Pxr* DNA メチル化率の変化

2型糖尿病モデルマウスである *db/db* マウス、そのコントロールマウスである *db/m* マウスの腎組織から、ソーターで近位尿細管を単離し、*Pxr* DNA メチル化率を COBRA 法で解析した。*db/db* マウス近位尿細管細胞の *Pxr* DNA メチル化率は、TSS から 1000bp 以上下流の部位で *db/m* マウス近位尿細管細胞に比較して有意に低値だった。データは平均±標準誤差で示した。* $p < 0.05$ 対 *db/m* マウス群。サンプル数=各群 4。

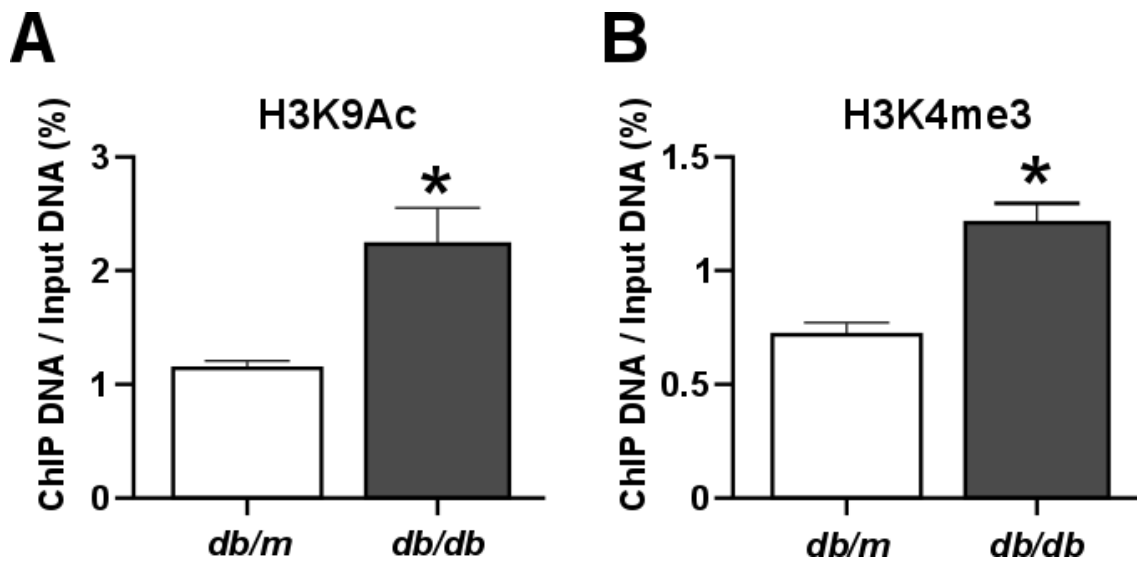


図5 *db/db* マウス近位尿細管細胞におけるヒストン修飾の変化

Pxr DNA プロモータ領域 (TSS-189~335bp) の DNA とヌクレオソームを形成するヒストンを対象に、発現亢進型ヒストン修飾であるヒストン3リジン9アセチル化 (H3K9ac; 図5 A) およびヒストン3リジン4トリメチル化 (H3K4me3; 図5 B) の量を、ChIP法を用いて計量した。いずれのヒストン修飾も、*db/db* マウス近位尿細管細胞において *db/m* マウス近位尿細管細胞と比較して有意に多かった。データは平均±標準誤差で示した。* $p < 0.05$ 対 *db/m* マウス群。サンプル数は H3K9Ac では各群 6、H3K4me3 では各群 8。

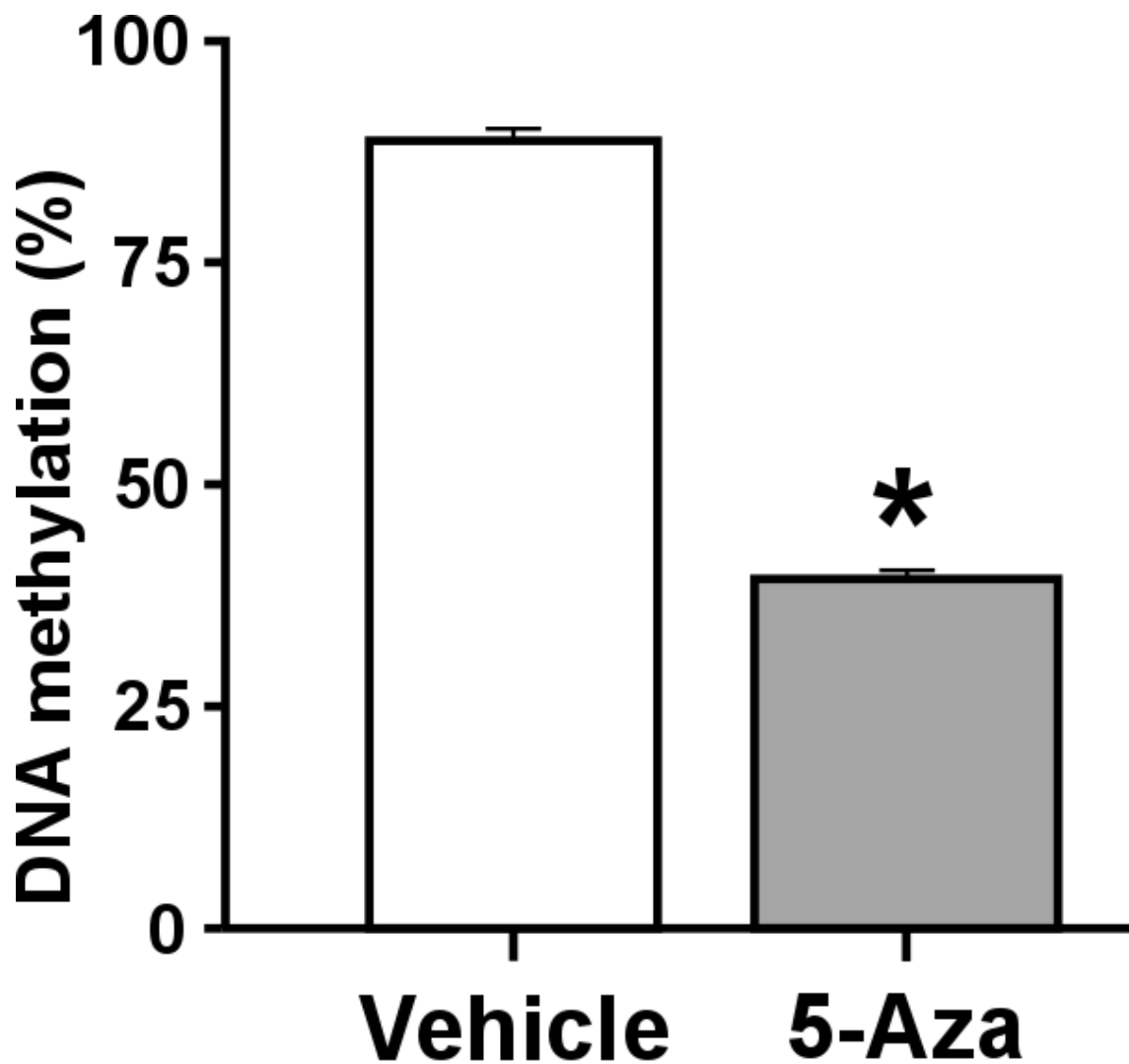


図6 DNA メチル化酵素阻害薬(5-Aza)によるヒト近位尿細管細胞での *PXR* DNA メチル化変化

ヒト近位尿細管培養細胞である HK2 細胞に 5-Aza-2'-deoxycitizine (5-Aza) を投与し、*PXR* DNA メチル化率を COBRA 法で解析した。5-Aza によって、*PXR* DNA メチル化率は有意に低下した。データは平均±標準誤差で示した。

* $p < 0.05$ 対 Vehicle 群。サンプル数=各群 5。

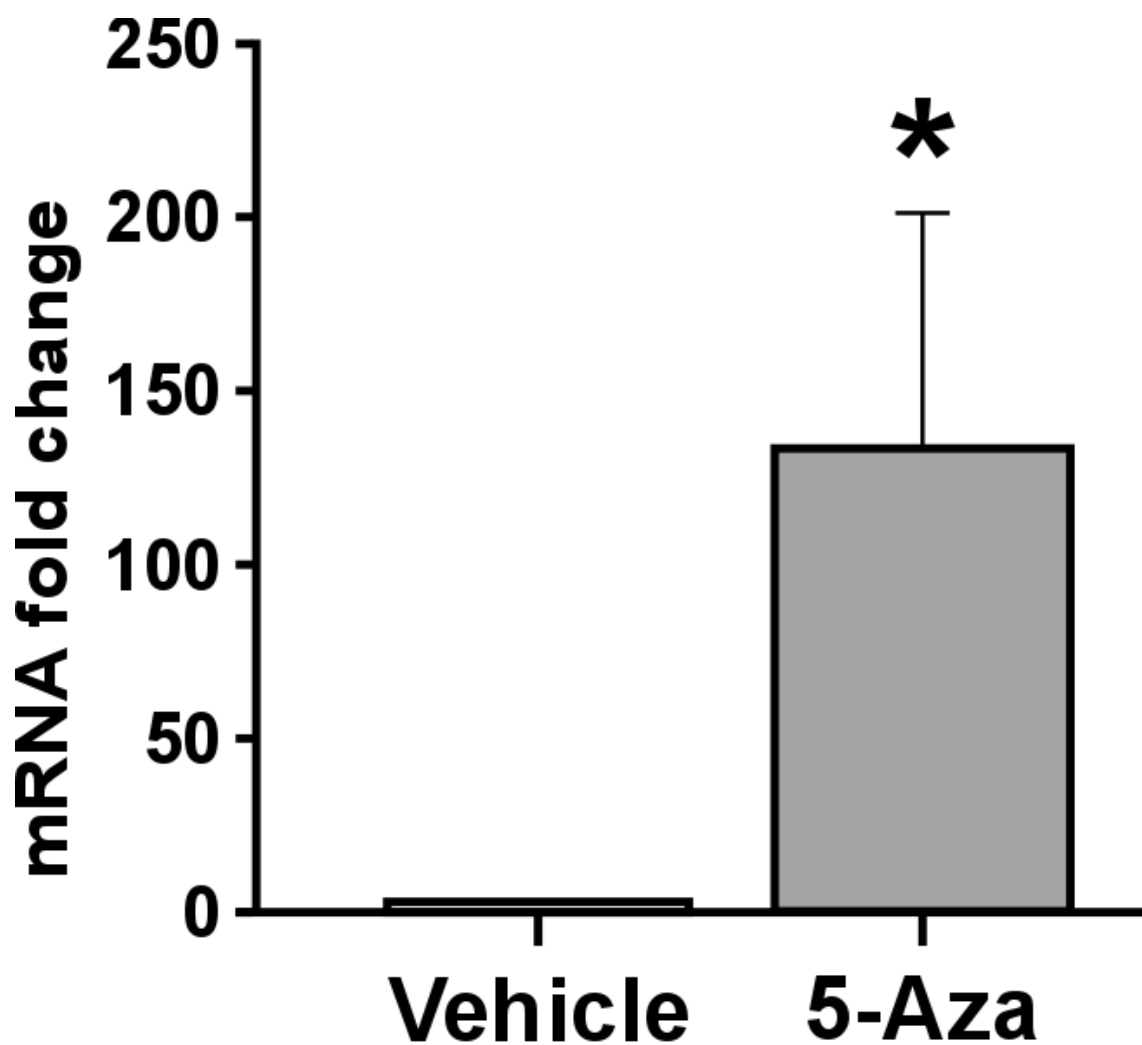


図7 DNA メチル化酵素阻害薬(5-Aza)によるヒト近位尿細管細胞での *PXR* mRNA 発現変化

ヒト近位尿細管培養細胞である HK2 細胞に 5-Aza-2'-deoxycitizine (5-Aza) を投与し、*PXR* mRNA 発現量を qRT-PCR で解析した。5-Aza によって、*PXR* mRNA 発現は有意に増加した。データは平均±標準誤差で示した。* $p < 0.05$ 対 Vehicle 投与群。サンプル数=各群 5。

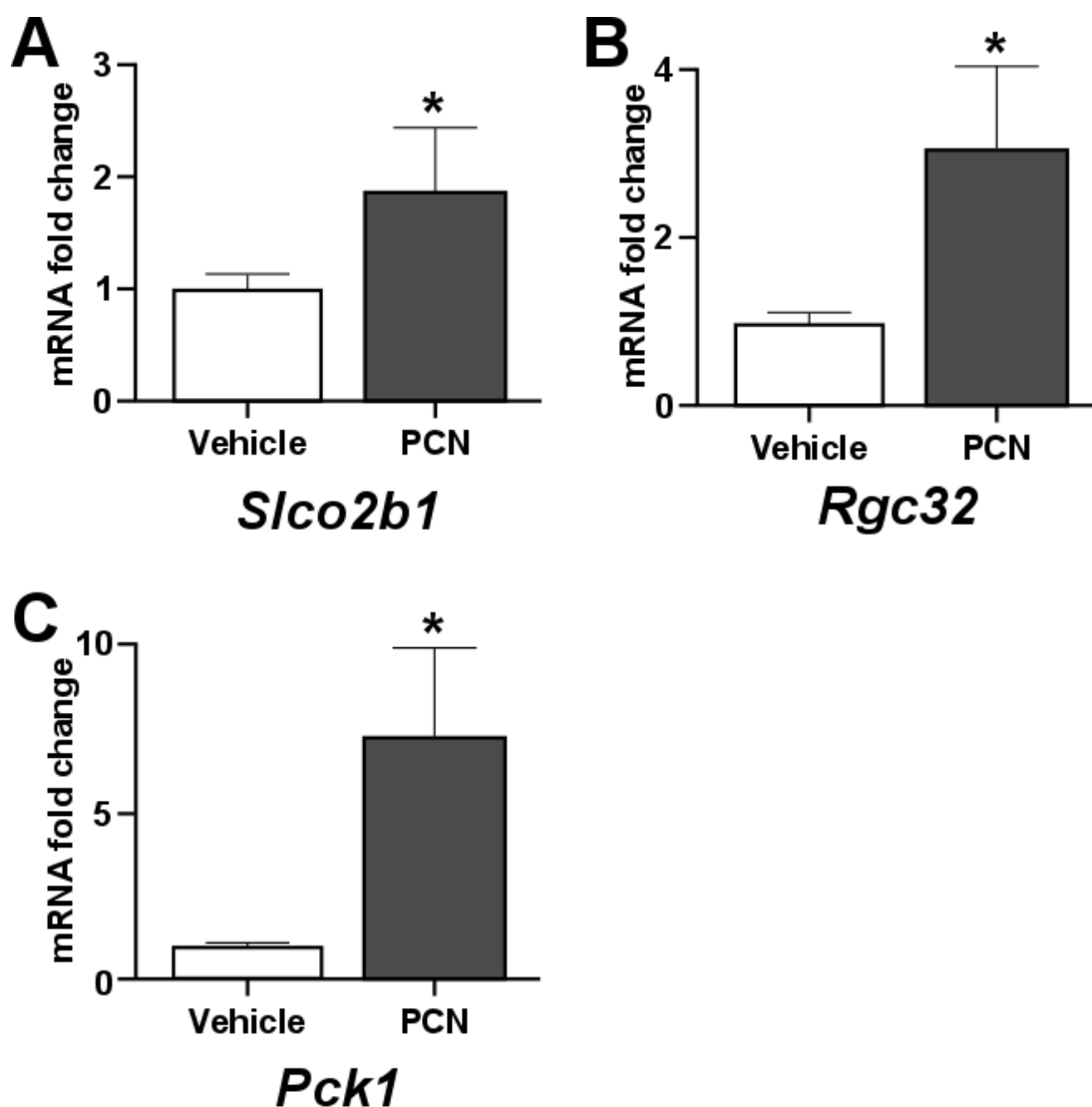


図8 PXR アゴニスト投与で腎臓内の発現が変化した遺伝子

8週齢の db/m マウスに PXR アゴニスト (Pregnane-16 α -carbonitrile: PCN) 100mg/kg/回 1日1回連続2日間腹腔内投与したところ、腎臓内で薬物代謝トランスポータ遺伝子の一つである *Slco2b1* (図8A)、線維化遺伝子 *Rgc32* (図8B)、糖新生酵素遺伝子 *Pck1* (図8C) の mRNA 発現が増加した。データは平均 \pm 標準誤差で示した。* p <0.05 対 Vehicle 投与群。サンプル数=各群 5。

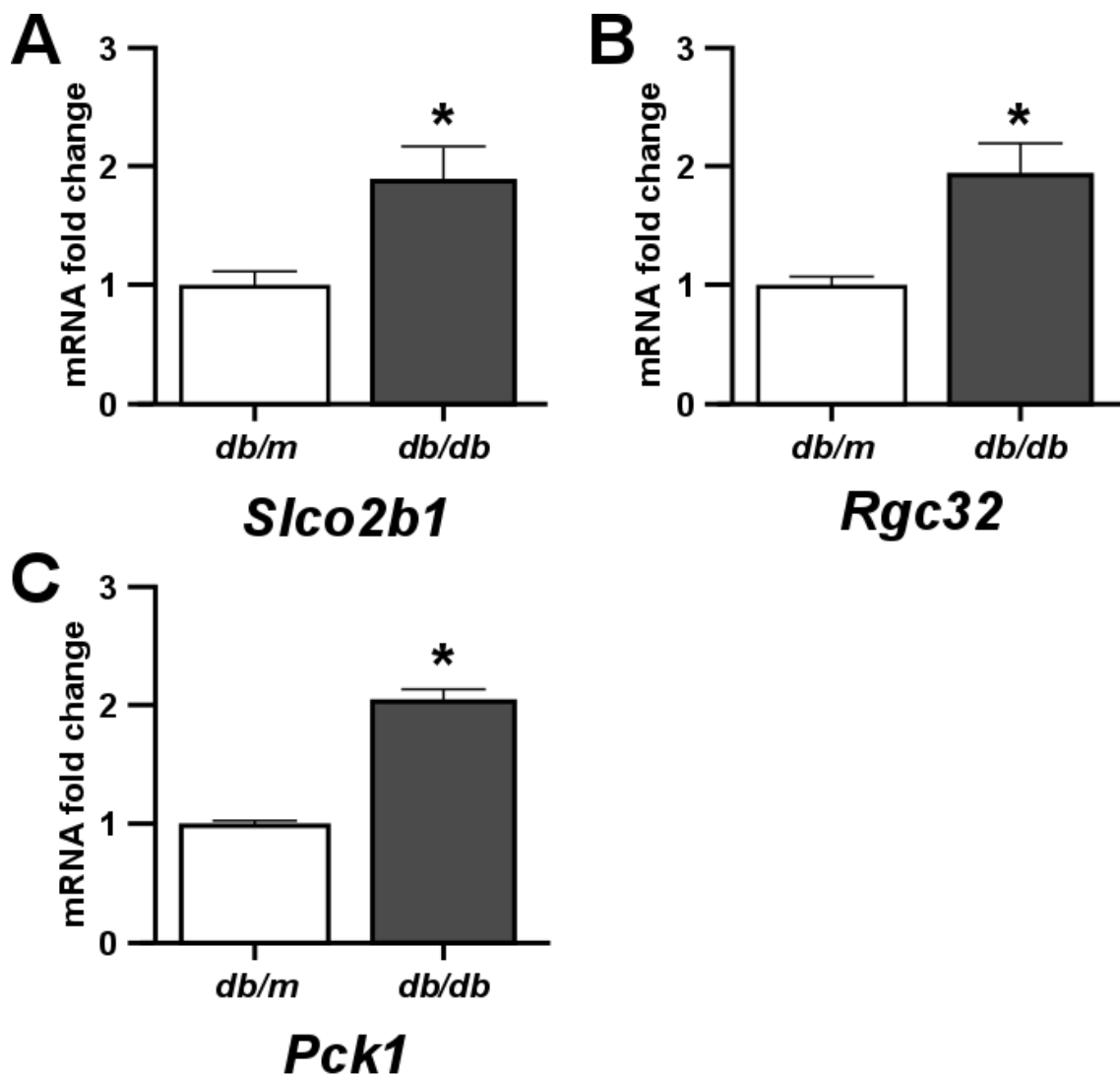


図9 *db/db* マウスにおける 3 遺伝子の腎臓での発現変化

8 週齢の *db/m* マウスと *db/db* マウスで、3 遺伝子の腎臓での発現を qRT-PCR で解析した。*db/db* マウスでは、*db/m* マウスと比較して腎臓内の 3 遺伝子の発現は有意に多かった。データは平均±標準誤差で示した。* $p < 0.05$ 対 *db/m* マウス群。サンプル数=各群 5。

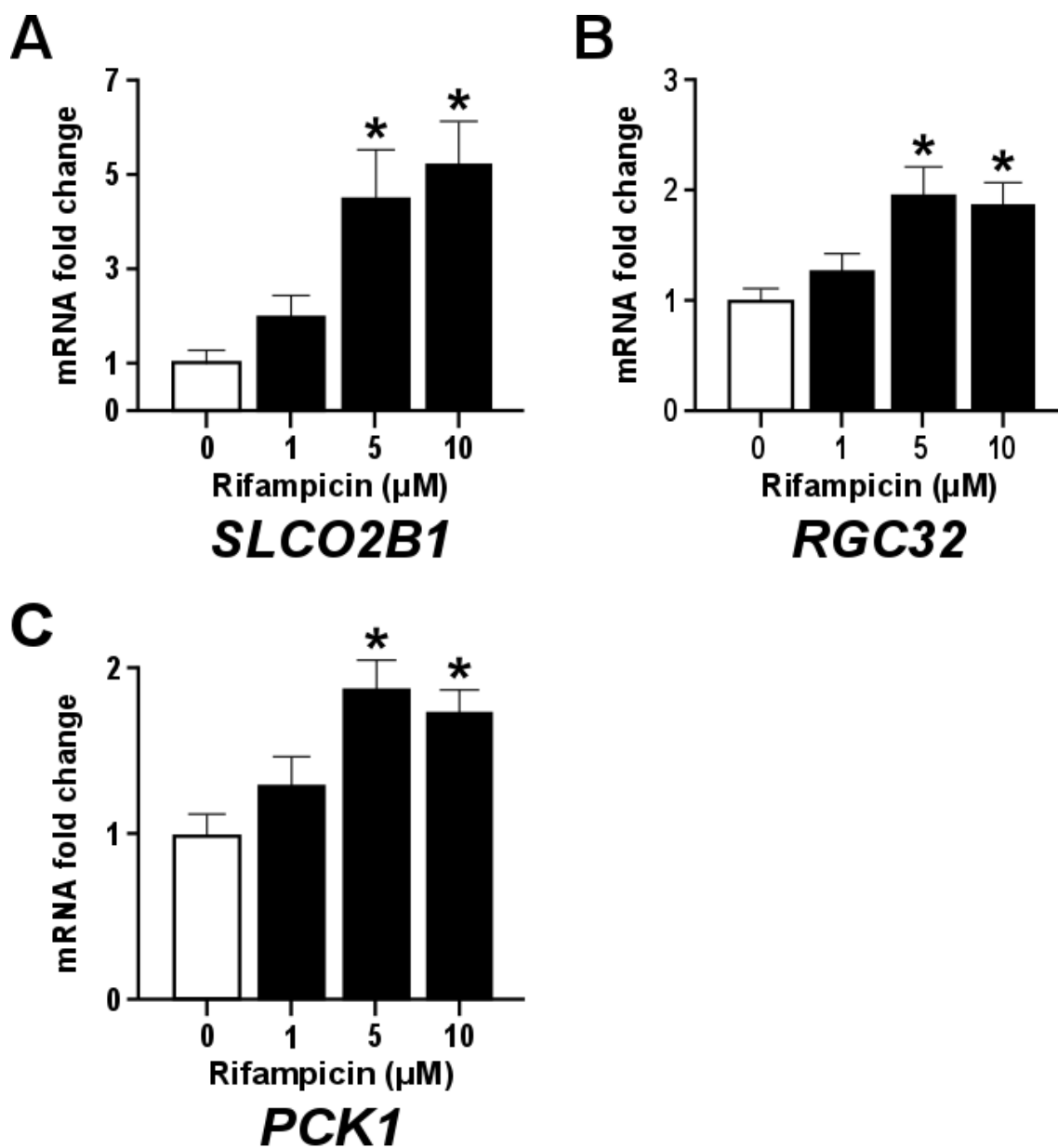


図 1 0 HK2 細胞における PXR アゴニストによる 3 遺伝子の発現変化

ヒト尿細管培養細胞である HK2 細胞を用いて、ヒト PXR アゴニストである Rifampicin によるこれらの遺伝子発現の変化を、qRT-PCR で解析した。Rifampicin の投与で、これら 3 遺伝子の発現は濃度依存性に増加した。データは平均±標準誤差で示した。* $p < 0.05$ 対 Vehicle 投与群。サンプル数=各群 5。

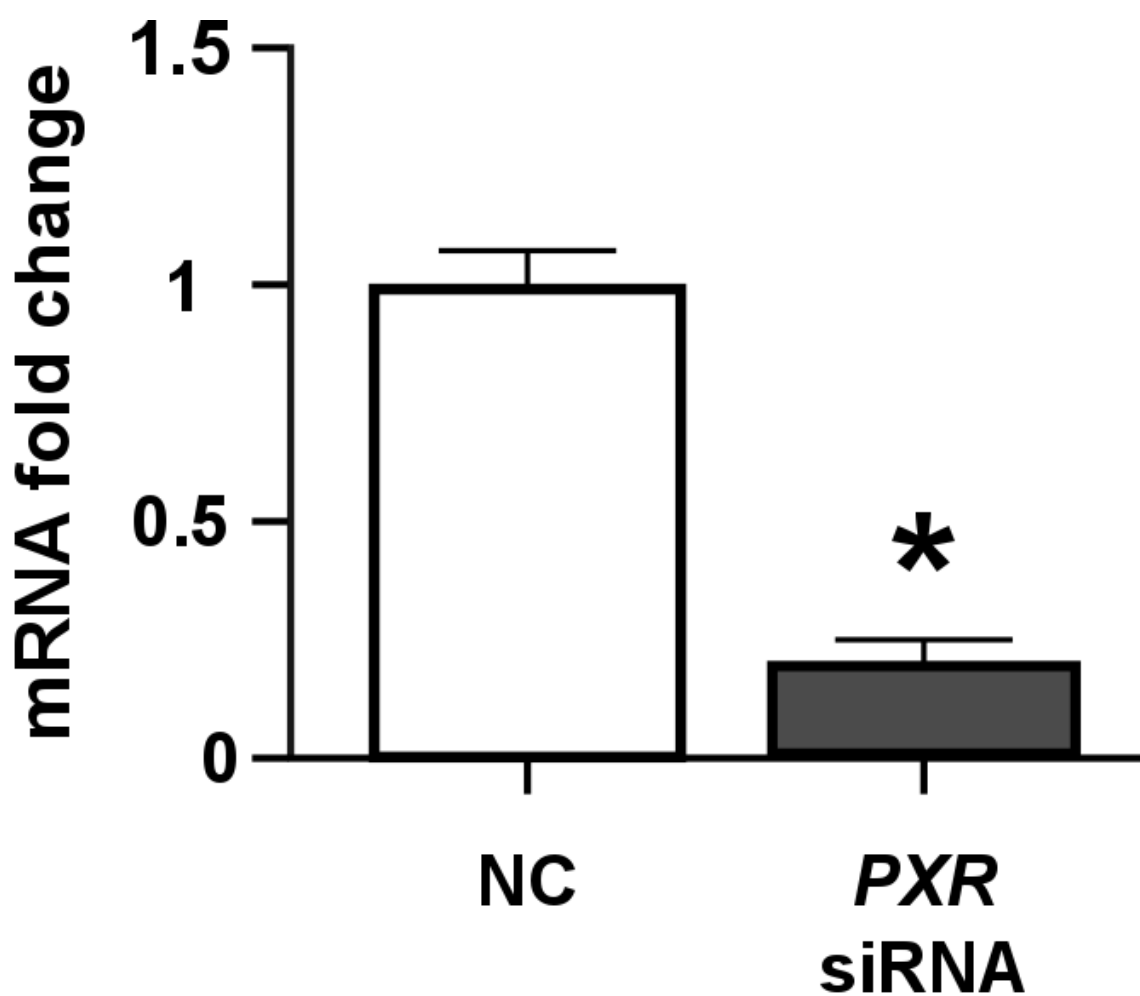


図 1 1 HK2 細胞における *PXR* siRNA による *PXR* mRNA ノックダウン効率

HK2 細胞に、*PXR* siRNA を投与した場合の *PXR* mRNA 発現変化を qRT-PCR で解析して確認した。*PXR* mRNA 発現は、コントロールと比較して *PXR* siRNA 投与によって 20%程度まで抑制された。データは平均±標準誤差で示した。* $p < 0.05$ 対 Negative Control (NC) 投与群。サンプル数=各群 5。

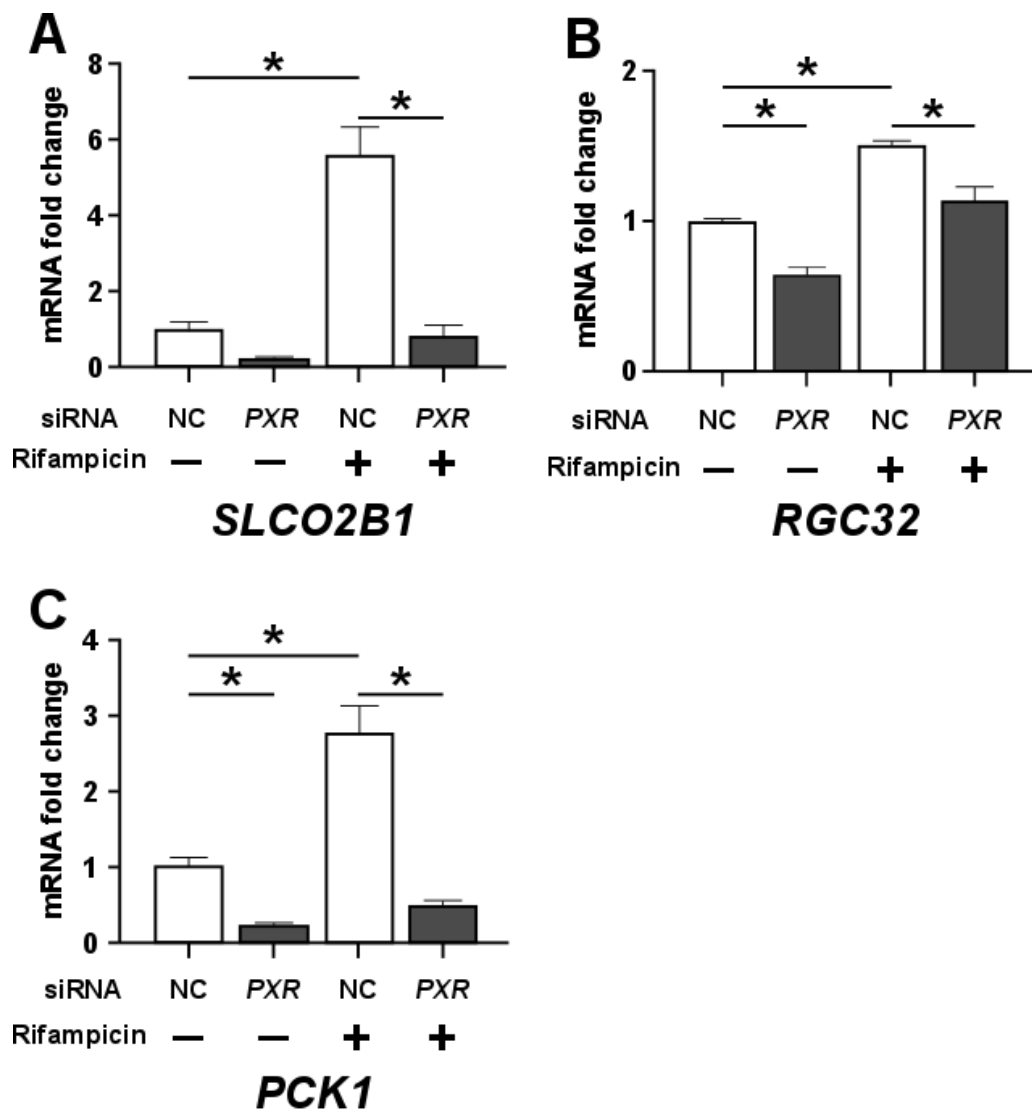


図 1 2 HK2 細胞における *PXR* ノックダウンによる 3 遺伝子の発現変化

HK2 細胞の *PXR* をノックダウンした場合の 3 遺伝子の発現変化を qRT-PCR で解析した。3 遺伝子の発現は、コントロールと比較して *PXR* ノックダウンによって *SLCO2B1* を除き有意に抑制された。*SLCO2B1* も抑制傾向を認めた。Rifampicin による発現増加は、3 遺伝子いずれも *PXR* ノックダウンによって有意に抑制された。データは平均±標準誤差で示した。 $*p < 0.05$ 対照はそれぞれ棒グラフで示した。サンプル数は下記の通り。各図の棒グラフが表す群を左から 1

群、2群、3群、4群と定義すると、Aの1群は10、2群は6、3群は5、4群は4。Bは各群5。Cの1群と2群は9、3群と4群は5。