

公募助成「腎不全病態研究助成」研究サマリー

研 究 名	慢性腎臓病に伴う骨ミネラル代謝異常におけるエピゲノムの網羅解析
所 属 機 関	東京慈恵会医科大学 腎臓高血圧内科
氏 名	内山 威人
<p>[目的] エピジェネティクスとは DNA の塩基配列の変化は伴わず継承される遺伝子発現変化であり、その異常は様々な疾患を引き起こし、治療ターゲットとなっている。CKD に伴う骨ミネラル代謝異常 (CKD-MBD) においては、その増悪に重要な役割を担うとされている Klotho 遺伝子がマウス尿細管において DNA メチル化を引き起こし、腎線維化と関連することが報告されているがまだまだ少ない。そこで我々は続発性副甲状腺機能亢進症の進展過程に着目しヒストンコードにどのような変化が起こり、発症機構や生理機能にどのような影響を与えるかを解析することを目的とした。</p> <p>[方法] 二次性副甲状腺機能亢進症 (SHPT) を呈する血液透析患者の副甲状腺と、対象となる甲状腺癌患者よりやむを得ず温存できず摘出された副甲状腺を用いて、免疫沈降法と次世代高速シーケンサーとを組み合わせ (ChIP-seq) 解析する。抗体は転写活性を意味する h3K4me、H3K9Ac、転写抑制を意味する H3K9me2、H3K9me3、H3K27me を用いる。ここから得られた結果から鍵遺伝子を同定し、in situ ハイブリダイゼーション法や免疫組織化学法、分子生物学的実験を行う。</p> <p>[結果] ヒト副甲状腺検体に関しては、SHPT 患者においては男性 5 例、女性 2 例のサンプルを採取できた。しかしながら、近年甲状腺がん手術は可能な限り副甲状腺を温存するため、対象となる患者の副甲状腺採取が行えないため対象疾患を拡大、頭頸部癌を追加した結果男性 4 例の対象検体を採取できた。糖尿病は様々な臓器でのエピジェネティックな修飾を惹起するため、糖尿病を有する患者を除外した結果 SHPT 患者においては男性 3 例、女性 1 例、対象となる頭頸部癌患者は男性 2 例の検体を採取できた。統計学的処理のため、対象となる検体がもう 1 例採取できたら ChIP-seq を行う予定である。</p> <p>次にヒト副甲状腺検体が採取できるまで、ChIP-seq で得られた鍵遺伝子以外で、ChIP-qPCR を用いて解析を行う候補遺伝子が必要であり、その探索はアデニン誘発腎不全モデルラットを用いて行った。8 週齢のウィスターラットに、2 週間 0.75%アデニン含有、非含有にリン濃度を 2 種類に分け (高リン食 (1.3%、HP)、正リン (0.9%、NP)) 与え計 4 群で解析した。CKD NP 群と CKD-HP 群で腎不全の程度に差は認めず、低カルシウム血症、および高リン血症を認めたのは CKD HP 群のみで、PTH は CKD NP、CKD HP 群で有意に上昇し、さらにこの両者では CKD HP 群の方が有意に高値であった。副甲状腺を切離し、RNA を抽出、TaqMan probe を用いて real time RT-PCR を行った。副甲状腺発生に重要な遺伝子に着目し、Six1、Six4、Eyal、Pax1、Pax9、Tbx1、Gcm2、MafB、GATA3 の遺伝子発現を解析したところ、Gcm2 のみが有意な変化を認め、CKD NP 群、CKD HP 群で減少した。ヒトでの ChIP-seq での解析終了後、その結果で得られた遺伝子に加え Gcm2 遺伝子の ChIP-qPCR を行う予定とした。</p>	