

エピジェネティック制御機構に基づくヒト腎臓 SGLT2 遺伝子の発現調節機構の解明

武居, 宏明

<https://doi.org/10.15017/1931848>

出版情報 : Kyushu University, 2017, 博士 (創薬科学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

博士論文

エピジェネティック制御機構に基づくヒト腎臓 *SGLT2* 遺伝子の
発現調節機構の解明

2018 年

九州大学大学院 薬学府 創薬科学専攻

臨床薬学講座 薬物動態学分野

武居 宏明

目次

略語	1
緒言	2
第1章 ヒト腎臓におけるヌクレオソーム位相を介した <i>SGLT2</i> の発現調節機構の解明	
1.1 序論.....	7
1.2 方法.....	9
1.3 結果.....	31
1.3.1 HK-2 細胞における <i>SGLT2</i> 5'-FR の転写活性および <i>SGLT2</i> mRNA 発現量の定量	31
1.3.2 HK-2 細胞およびヒト腎組織における <i>SGLT2</i> 5'-FR のヌクレオソーム占有解析	33
1.3.3 TSA 処理による <i>SGLT2</i> 発現および <i>SGLT2</i> 5'-FR のヌクレオソーム占有状態への影響.....	35
1.3.4 TSA 処理による HNF1 α 発現量および <i>SGLT2</i> 5'-FR への HNF1 α 結合頻度への影響.....	38
1.3.5 HNF1 α 発現細胞における <i>SGLT2</i> 5'-FR の転写活性.....	39
1.3.6 HNF1 α 発現細胞における TSA 処理の <i>SGLT2</i> mRNA 発現量への影響評価.....	41
1.3.7 ヒト腎臓、肝臓および小腸におけるヌクレオソーム占有状態の解析	42
1.4 考察.....	43
第2章 高糖尿状態における <i>SGLT2</i> 遺伝子発現変動に対するヒストンアセチル化の影響評価	
2.1 序論.....	49
2.2 方法.....	51
2.3 結果.....	54
2.3.1 各グルコース濃度条件下での <i>SGLT2</i> mRNA 発現量および <i>SGLT2</i> プロモーター領域のヒストンアセチル化状態の解析.....	54
2.3.2 ヒト腎組織および HK-2 細胞における HDAC 活性の比較	55
2.3.3 TSA 処理条件下での高グルコース濃度による <i>SGLT2</i> mRNA 発現量およびヒストンアセチル化への影響評価.....	56
2.3.4 TSA 処理条件下での高グルコース濃度による <i>SGLT2</i> プロモーター領域のヌクレオソーム占有率および HNF1 α 結合頻度への影響評価	58
2.3.5 各グルコース濃度条件下での acetyl-CoA の定量.....	61
2.4 考察.....	62
総括	65
引用文献.....	66
試薬一覧.....	75

略語

5'-FR	5'-flanking region	5'上流域
AcH3	acetyl histone H3	アセチル化ヒストン H3
ChIP	chromatin immunoprecipitation	クロマチン免疫沈降
CoA	coenzyme A	補酵素 A
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
HAT	histone acetyltransferase	ヒストンアセチル基転移酵素
HDAC	histone deacetylase	ヒストン脱アセチル化酵素
HDACi	histone deacetylase inhibitor	ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤
HK-2	human kidney-2	ヒト腎近位尿細管上皮由来細胞株
HNF	hepatocyte nuclear factor	肝細胞核因子
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
NOMe-Seq	nucleosome occupancy and methylome sequencing	ヌクレオソームおよびメチル化状態解析手法
NuSA	nucleosome-scanning assay	ヌクレオソーム占有状態解析
RPL13	ribosomal protein L13	リボソームタンパク質 L13
SD	standard deviation	標準偏差
SGLT2	sodium glucose co-transporter 2	Na ⁺ 依存性グルコーストランスポーター
TSA	trichostatin A	トリコスタチン A (HDACi の一種)
TSS	transcription start site	転写開始点

緒言

腎臓は血液をろ過して尿を作る機能を有しており、生体内の老廃物や有害物質の排泄や、血液中の水分や体液、栄養分のバランス調整に重要な器官である。そのため、腎機能の低下は様々な疾患のリスクとなり得る。近年では、2型糖尿病患者の急増に伴って、腎機能低下が認められる患者が増加の一途をたどっていることから、腎機能低下の防止に向けた血糖コントロールが重要であると言える。2型糖尿病患者における血糖コントロールは食事療法や運動療法が基本であり、それでも十分な高血糖の改善が認められない場合には、経口血糖降下薬を用いた薬剤療法が行われる。これまでに、数多くの経口血糖降下薬が開発され、個々の患者の病態に応じた糖尿病治療が行われてきた一方で、依然として多くの患者で血糖値の更なる改善が求められている。従って、新たな経口血糖降下薬が開発されることは常に望まれており、糖尿病の治療戦略の確立に向けた新たな知見を見出すことが必須と言える。

近年では、新規経口血糖降下薬として **Sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2)** 阻害薬の開発が進められている。**SGLT2** はヒト腎近位尿細管上皮細胞に特異的に発現するグルコーストランスポーターであり、尿細管のグルコース再吸収に重要な働きを有している。これまでの報告により、**SGLT2** の機能阻害によって、尿中のグルコース排泄の促進に伴う血糖降下作用が認められていることや、2型糖尿病患者において **SGLT2** 遺伝子の発現量が変動することから、2型糖尿病の治療ターゲットとして注目を集めている [1-3]。このように、2型糖尿病における **SGLT2** の機能や重要性に関する報告が多くあがっている一方で、生体内での発現調節に関する報告は依然として少なく、どのようなメカニズムで **SGLT2** 遺伝子が発現調節を受けているかについてはほとんど明らかとなっていない。そのため、今後の研究によって **SGLT2** 遺伝子の発現調節機構が明らかとなれば、**SGLT2** を基盤とした新たな2型糖尿病の治療戦略を確立することが可能ではないかと推測される。

2003年のヒトゲノム計画の完了を機に、ゲノム解読からゲノムの機能・制御の解明へとライフサイエンス研究の主流が移る中で、エピジェネティクスによる遺伝子発現調節に注目が集まるようになった。エピジェネティクスとは塩基配列の変化を伴わない後天的な遺伝子発現調節機構と定義されており、ヒストン修飾、DNAメチル化、micro RNAなどのメカニズムが知られている。エピジェネティクスに関する研究の論文数は2000年頃から増加し始め、2型糖尿病との関連を示した論文もここ数年で多くあがっ

ている。例を挙げると、酸化ストレスに対する生体防御因子 Nrf2 (nuclear factor-like 2) は、2 型糖尿病によって発現量の低下が認められており、この発現調節にエピジェネティクスが寄与することが示唆されている [4-7]。また、食事の影響によるグルコーストランスポーターの遺伝子発現変動にエピジェネティクスが寄与することを明らかとした報告が多く挙げられている [8-11]。そのため、2 型糖尿病患者における *SGLT2* 遺伝子発現変動においてもエピジェネティクスが寄与する可能性が推測され、これらの関係性を明らかとすることで、*SGLT2* 遺伝子の発現調節機構に関する新たな知見が得られると考えられる。

そこで本研究では、エピジェネティクス制御に着目して、ヒト生体内における *SGLT2* 遺伝子の発現調節機構の解明および 2 型糖尿病患者での *SGLT2* 遺伝子の発現変動機構の解明に向けた研究を行った。

第 1 章では、*SGLT2* 遺伝子の発現調節に関与するエピジェネティック制御機構および転写調節因子の同定とその機能評価について検討した。第 2 章では、グルコースがエピジェネティック制御を介した腎近位尿細管細胞内の *SGLT2* 遺伝子発現に与える影響およびその調節機構の解明に向けた検討を行った。本研究の概念図を以下に示す (Fig. 1)。

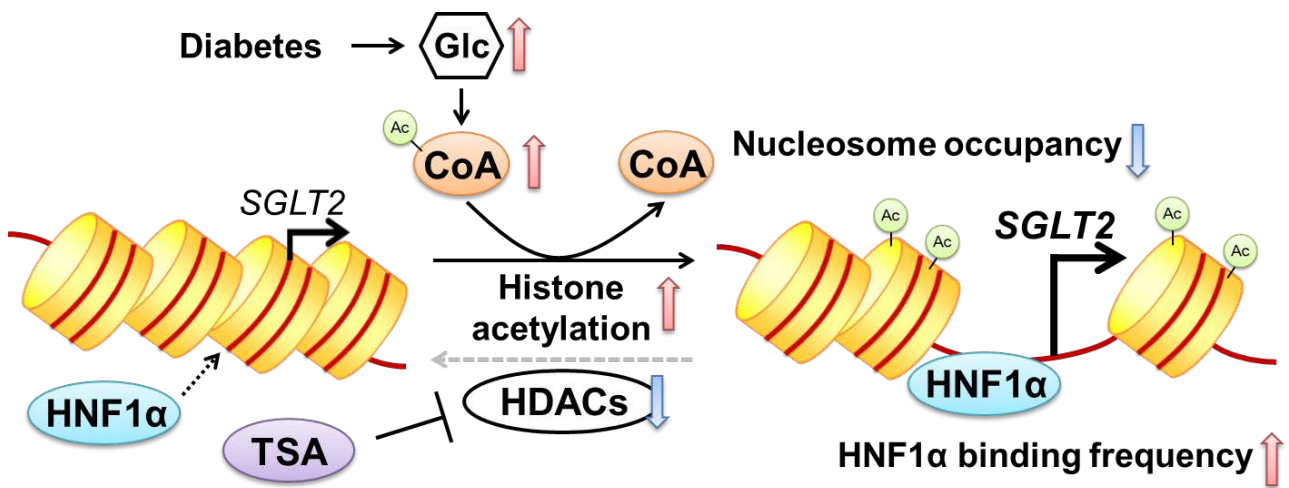


Fig. 1 Scheme of regulatory mechanisms for the *SGLT2* gene in the human kidney

Yellow columns represent nucleosomes. Red lines represent DNAs. Bold arrows indicate the transcription start site. Acetyl-CoA, Acetyl-coenzyme A; Glc, glucose; HDACs, histone deacetylases; HNF1 α , hepatocyte nuclear factor 1 alpha; TSA, trichostatin A; Ac, acetyl group.

第1章

ヒト腎臓におけるヌクレオソーム位相を介した
SGLT2 の発現調節機構の解明

1.1 序論

腎臓はヒト生体内のグルコース恒常性を維持する重要な臓器であり、糖新生や血中からのグルコースの濾過、グルコースの再吸収を機能として有する。糸球体で濾過されたグルコースは腎近位尿細管上皮細胞に存在するグルコーストランスポーター sodium-glucose co-transporters (SGLTs) によって細胞内に取り込まれ、glucose transporters (GLUTs) によって血中へと戻される [12–15]。健常成人では 180 g/day のグルコースが糸球体で濾過され、その大半 (約 90%) はセグメント S1、S2 に発現する SGLT2 (*SLC5A2*) を介して細胞内に取り込まれる [15]。家族性腎性糖尿患者では *SGLT2* 遺伝子の翻訳領域から様々な一塩基多型が同定されており、腎近位尿細管上皮細胞における SGLT2 の機能低下が生じることで、先天的な尿中からのグルコース排泄を引き起こしていると考えられている [16–19]。実際、マウス *Sgl2* をノックアウトすることにより、尿中からのグルコース排泄が認められたという報告があがっている [20, 21]。以上より、SGLT2 は尿細管におけるグルコースの再吸収に重要な役割を有するトランスポーターであると言える。

SGLT2 の発現部位や機能に関する報告が多くあがっている一方で、*SGLT2* 遺伝子の発現調節機構についての報告は未だに少ない。これまでに *SGLT2* の発現調節を担う転写因子の特定を試みた研究がいくつか報告されている。*SGLT2* の発現調節に最も重要な転写因子と考えられている hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 α は、*SGLT2* 5' 上流域 (5'-flanking region, 5'-FR) に直接的に結合することで、*SGLT2* の発現を調節することが明らかとなっている [22–24]。また、HNF4 α や Sp1 といった転写因子についても *SGLT2* の発現調節に寄与しているとの報告があがっている [25, 26]。これらの転写因子は腎臓において十分な発現が認められているが、肝臓や小腸などの様々な組織でも同様に十分な発現が認められている。しかし、腎臓以外の組織では *SGLT2* の発現がほとんど認められておらず、転写因子のみでは腎臓特異的に発現するメカニズムを十分に解明できていない。従って、ヒト生体内における *SGLT2* 遺伝子の詳細な発現調節機構を解明していく上で、転写因子による発現調節とは異なるアプローチが求められる。

ヌクレオソーム (nucleosome) はクロマチン構造の基本単位で、約 147 bp の DNA とヒストンタンパク質 (H2A, H2B, H3, and H4) で構成されている。ヌクレオソームを形成する領域では、転写因子や RNA ポリメラーゼの DNA への結合が阻害される [27, 28]。従って、遺伝子の転写調節に重要な領域がヌクレ

オソーム占有状態 (nucleosome occupancy) である場合、その遺伝子は十分な転写活性を有していないと考えられる。ヌクレオソーム占有状態は構成するヒストンタンパク質が化学的修飾を受けることで変動することが知られており、ヒストン H3 のリシン残基へのアセチル化やメチル化といった修飾状態が変動することで遺伝子発現が変動する。近年の研究によって、ヌクレオソームが様々な遺伝子のプロモーター領域に対する組織特異的な転写因子の結合を制御することが明らかとなっており、結果として組織特異的な遺伝子発現に寄与していると考えられている [29–33]。一方で、*SGLT2* 遺伝子の発現調節とヌクレオソーム占有状態の関係性を明らかにした報告はあがっていない。そのため、*SGLT2* 遺伝子の転写調節領域におけるヌクレオソーム占有状態を解析することで、腎臓特異的な *SGLT2* 遺伝子の転写調節機構に関する新たな知見を得られると考えた。

そこで本研究では、*SGLT2* 5'-FR におけるヌクレオソーム占有状態が *SGLT2* 遺伝子の転写調節に与える影響の評価を行った。始めに、腎近位尿細管上皮由来細胞株およびヒト腎組織を使用し、*SGLT2* 5'-FR のヌクレオソーム占有状態と転写活性の関係性を明らかにした。続いて、ヌクレオソーム占有率を低下させた時の *SGLT2* 遺伝子発現への影響を解析し、発現調節に重要な転写因子を特定した。最後に、*SGLT2* 遺伝子発現の腎臓特異性に *SGLT2* 5'-FR のヌクレオソーム占有状態が寄与することを明らかにするため、ヒト生体内において *SGLT2* 遺伝子の発現が認められていない肝臓および小腸を用いてヌクレオソーム解析を行った。

1.2 方法

1.2.1 HK-2 細胞の培養

1.2.1.1 Culturing

ヒト腎近位尿細管上皮由来細胞株 HK-2 は 37°C、5% CO₂ 条件下にて Dulbecco's Modified Eagle Medium: Ham's F-12 Nutrient Mixture (DMEM/F-12)/10% fetal bovine serum (FBS) を用いて培養した。細胞の剥離には TrypLE™ Express Enzyme (1X), no phenol red を使用した。剥がした細胞の数をトリパンブルー一色素排除法にて計測し、6-well plate および 24-well plate にそれぞれ 2.0×10^5 cells/well および 0.2×10^5 cells/well となるように播種を行った。播種から 72 時間後には DMSO (control) および 1.0 μ M trichostatin A (TSA) を含む培地に交換し、24 時間培養した。

1.2.1.2 Transfection

HK-2 へのプラスミドの導入は FuGENE® HD Transfection Reagent のプロトコルに従い、播種から 24 時間後に以下の I-III の試薬を調製して、各 well に添加した。

[Reagents]

	I	II	III
Plate	6-well	24-well	24-well
Cells/well	1.5×10^5	0.2×10^5	0.2×10^5
Opti-MEM	Up to 150 μ L	Up to 25 μ L	Up to 25 μ L
Expression plasmid	500 ng	-	500 ng
Reporter construct	-	0.089 pM	0.089 pM
pGL4.70 plasmid	-	25 ng	25 ng
FuGENE® HD Transfection Reagent	2 μ L	Vectors (μ g) \times 4 μ L	Vectors (μ g) \times 4 μ L

□ 0.089 pM \approx 250 ng of the pGL4.10 plasmid

I, transfection of an expression plasmid

II, transfection of a reporter construct

III, co-transfection of an expression plasmid and a reporter construct

1.2.2 SGLT2 reporter constructs の作製

SGLT2 5'-FR の転写活性および転写調節に重要な領域を解析するために、In-Fusion cloning にて pGL4.10 [*luc2*] Vector (pGL4.10) に SGLT2 5'-FR (-3185/+18) を導入した reporter construct を作製した。これを鋳型として、段階的に塩基を欠失させた deletion constructs (-2320/+18, -1587/+18, -485/+18, -154/+18, and -44/+18) は部位特異的変異導入法 (QuikChange II site-directed mutagenesis method) にて作製し、HNF1 α -binding motif (-51/-37) を欠失させた construct [del(-51/-37)] は In-Fusion cloning にて作製した。

1.2.2.1 Restriction enzyme digestion

pGL4.10 を KpnI/HindIII で処理し、反応後は NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up を用いて精製した。

[Reagents]

10×M Buffer	5 μ L
KpnI (10 U/ μ L)	0.75 μ L
HindIII (15 U/ μ L)	0.5 μ L
pGL4.10 plasmid	2 μ g
Nuclease-free water	
<hr/>	
Total	50 μ L

[Thermal cycling conditions]

Digestion	37°C	60 min
Inactivation	70°C	15 min

1.2.2.2 PCR

ゲノム DNA を鋳型として、SGLT2 5'-FR (-3185/+18) を増幅させるプライマーを設計し、PCR 法により増幅した。Primer Design tool for In-Fusion[®] HD Cloning Kit を使用し、KpnI/HindIII-digested pGL4.10 の 2 本鎖末端配列に相同な 15 塩基を 5'末端に付加したプライマーを設計した (Table 1)。反応後、アガロースゲル電気泳動にて増幅を確認し、NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up を用いて PCR product を精製した。

[Reagents]

Sterile distilled water	15.875 μ L
5 \times PrimeSTAR [®] GXL Buffer	5 μ L
2.5 mM dNTPs	2 μ L
Primer mix (10 μ M)	0.625 μ L
Prime STAR [®] GXL DNA polymerase	0.5 μ L
DNA	1 μ L
<hr/>	
Total	25 μ L

[Thermal cycling conditions]

Denaturation	98°C	10 s	} 30 cycles
Annealing	60°C	15 s	
Extension	68°C	1 min/kb	

1.2.2.3 In-fusion cloning

In-Fusion[®] HD Cloning Kit に従い、KpnI/HindIII -digested pGL4.10 に PCR product を導入した。

[Reagents]

5 \times In-Fusion HD Enzyme Premix	0.5 μ L
KpnI/HindIII -digested plasmid	12.5 ng
PCR product	12.5 ng
Sterile distilled water	
<hr/>	
Total	2.5 μ L

[Thermal cycling conditions]

In-Fusion reaction	50°C	15 min
--------------------	------	--------

1.2.2.4 Transformation

ECOS[™] Competent *E. coli* JM109 25 μ L に cloning product 2.5 μ L を加え、ECOS[™] 6分間プロトコルに従って形質転換を行った。

1.2.2.5 Insert check

SGLT2 5'-FR がベクターに導入されていることを確認するために、発生した単一のコロニーおよび

Table 1 に示すプライマーを用いて PCR を行った。各コロニーは新たな LB agar (1% ampicillin) に塗り、マスタープレートを作製した。PCR product はアガロースゲル電気泳動にて増幅を確認した。

[Reagents]

Gene RED PCR Mix Plus	5 μ L
Forward primer (10 μ M)	0.12 μ L
Reverse primer (10 μ M)	0.12 μ L
Nuclease-free water	4.76 μ L
<hr/>	
Total	10 μ L

[Thermal cycling conditions]

Initial denaturation	94°C	3 min	} 35 cycles
Denaturation	94°C	20 s	
Annealing	55°C	20 s	
Extension	72°C	10 s/kb	
Final extension	72°C	7 min	

1.2.2.6 Direct sequencing

増幅が確認されたコロニーを LB broth (1% ampicillin) 2 mL に移し、BioShaker BR-13UM にて振盪培養 (37°C, 200 rpm, 13 h) した後、NucleoSpin® Plasmid QuickPure にて抽出した plasmid DNA を用いて、DNA 配列を確認した。使用したプライマーは Table 1 に示す。反応後の精製には illustra™ Sephadex™G-50 Fine DNA Grade を使用した。Multi-Screen® Filtration System に充填し、滅菌 milli Q 300 μ L を加えて 2.5 時間静置した後、遠心 (1,000 \times g, 3min) して水分を除去した。反応後のサンプルを滴下し、再度遠心 (1,000 \times g, 3min) することで精製した。塩基配列の同定は九州大学医学研究院 教育・支援センターに委託し、ABI 3130xl DNA Sequencer にて配列を解析した。

[Reagents]

BigDye® Terminator v1.1 v3.1 5 \times Sequencing Buffer	2 μ L
Terminator Ready reaction mix®	0.33 μ L
Primer (10 μ M)	0.4 μ L
Plasmid DNA	250 ng/6 kb
Nuclease-free water	
<hr/>	
Total	10 μ L

[Thermal cycling conditions]

Initial denaturation	96°C	2 min	} 25 cycles
Denaturation	96°C	10 s	
Annealing	50°C	5 s	
Extension	60°C	4 min	

1.2.2.7 Plasmid DNA extraction

目的の配列が導入されたコロニーを LB broth (1% ampicillin) 2 mL で振盪培養 (37°C, 200 rpm, 10 h) した後、500 µL を LB broth (1% Ampicillin) 20 mL に移し、さらに振盪培養 (37°C, 200 rpm, 16 h) した。培養後は、QIAfilter plasmid Midi Kit に従い、plasmid DNA を精製した。

1.2.2.8 QuikChange II site-directed mutagenesis

QuikChange® Primer Design Program™ を用いて変異導入プライマー (Table 2) を作製し、plasmid DNA を鋳型に PCR を行った。反応後、鋳型の plasmid DNA を切断するために DpnI 処理を行い、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up で精製した。続いて、KpnI 処理を行い、SGLT2 5'-FR の一部を欠失させ、再度 NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up で精製した。

• PCR

[Reagents]

5×PrimeSTAR® GXL Buffer	5 µL
2.5 mM dNTPs	2 µL
Primer mix (10 µM)	0.625 µL
Prime STAR® GXL DNA polymerase	0.5 µL
Plasmid DNA	30 ng
Sterile distilled water	
<hr/>	
Total	25 µL

[Thermal cycling conditions]

1.2.2.2 参照

• DpnI digestion

[Reagents]

10× CutSmart® Buffer	2.5 μL	
DpnI (20 U/μL)	0.5 μL	
PCR product	22 μL	
Nuclease-free water	25 μL	
<hr/>		
Total	50 μL	

[Thermal cycling conditions]

Digestion	37°C	60 min
Inactivation	80°C	20 min

• KpnI digestion

[Reagents]

10×L Buffer	5 μL	
KpnI (10 U/μL)	0.5 μL	
Purified PCR product	24.5 μL	
Nuclease-free water	20 μL	
<hr/>		
Total	50 μL	

[Thermal cycling conditions]

Digestion	37°C	60 min
Inactivation	70°C	15 min

1.2.2.9 Ligation

KpnI による切断部位を ligation 反応により結合させた。

[Reagents]

2× Rapid Ligation Buffer	5 μL	
T4 DNA Ligase (1-3 U/μL)	1 μL	
KpnI digested PCR product	50 ng	
Nuclease-free water		
<hr/>		
Total	10 μL	

[Thermal cycling conditions]

Ligation	16°C	60 min
----------	------	--------

Table 1**Primer sequences for the cloning of SGLT2 reporter plasmids**

Primer		Sequence (5' to 3') ^a	Restriction enzymes
Cloning of the SGLT2 5'-flanking region			
-3185	Forward	TGGCCTAACTGGCCGGTACCTTCCCGACCGCCT	-
+18	Reverse	AGTACCGGATTGCCACTCCCCAGGATCTGCCCC	
In-Fusion cloning and site-directed mutagenesis			
Del(-51/-37)	Forward	GGCTCAGTGCCCCTGCTTCCCCTGGGGGAATCC	-
	Reverse	CAGGGGC ACTGAGCCGACAAGTCCCCCAGGTCT	
-2320	Forward	GTTTGTTAATGAAGGAAGGT <u>ACC</u> AGGAAGGAAGGAAAGA	KpnI
	Reverse	TCTTTCCTTCCTTCC <u>TGGTACC</u> TTCCTTCATTAACAAAC	
-1587	Forward	CCAACTGCTCTTTGTGGT <u>TACC</u> CTGACAAATGACACAC	KpnI
	Reverse	GTGTGTCATTGTCAGGGT <u>TACC</u> ACAAAGAGCAGTTGG	
-485	Forward	CAAAAATCTGGGCTGGGT <u>TACC</u> TAAAGGAGTGGGAAAGGA	KpnI
	Reverse	TCCTTTCCCCTCCTTTAAGT <u>TACC</u> CAGCCCAGATTTTTG	
-154	Forward	TGGAAGGGCCCAGGT <u>TACC</u> AAGACCAGCC	KpnI
	Reverse	GGCTGGTCTTGGGT <u>TACC</u> TGGGCCCTTCCA	
-44	Forward	GGCTCAGTGCCCCTGAGGT <u>TACC</u> ATTAATCCTTC	KpnI
	Reverse	GAAGGATTAATGGGT <u>TACC</u> TCAGGGGC ACTGAGCC	
Insert check			
pGL4.10	Forward	GCAGGTGCCAGAACATTCT	
	Reverse	CCGTCTTCGAGTGGGTAGAAT	
Direct sequencing			
Location		Sequence (5' to 3')	
SGLT2	Antisense	TGAGAGAAATCCAGTGCCAAGT	
	Antisense	CCTGAGATGAGAATTTGTGTGC	
	Sense	GCTTTGTTGGTTTTCTCCTTGTT	
	Sense	CCACACCCAGCCAGTCCTAC	
	Sense	GGAAGGATGAGCGGGAATTG	
pGL4.10	Sense	GCAGGTGCCAGAACATTCT	

^aThe restriction site is underlined, and nucleotide changes are marked in bold letters.

1.2.3 HNF1 α expression plasmid の作製

1.2.3.1 Restriction enzyme digestion

pcDNA3.1(+)-Vector (pcDNA3.1) を EcoRI/EcoR \square で処理し、反応後は NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up を用いて精製した。

[Reagents]

10 \times H Buffer	5 μ L
EcoRI (10 U/ μ L)	0.75 μ L
EcoR \square (10 U/ μ L)	0.75 μ L
pcDNA3.1 plasmid	2 μ g
Nuclease-free water	
<hr/>	
Total	50 μ L

[Thermal cycling conditions]

Digestion	37°C	60 min
Inactivation	70°C	15 min

1.2.3.2 PCR

HK-2 cells から作製した cDNA を鋳型として、HNF1 α 翻訳領域 を増幅させるプライマーを設計し、PCR 法により増幅した。HNF1 α 翻訳領域 の配列については、NCBI Reference Sequence: NM_000545.6 を参照した。Primer Design tool for In-Fusion[®] HD Cloning Kit を使用し、EcoRI/EcoR \square -digested pcDNA3.1 の 2 本鎖末端配列に相同な 15 塩基を 5'末端に付加したプライマーを設計した (Table 2)。反応後、アガロースゲル電気泳動にて増幅を確認し、NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up を用いて PCR product を精製した。反応条件については 1.2.2.2 項を参照。

1.2.3.3 In-Fusion cloning ~ plasmid DNA extraction

Table 2 のプライマーを使用し、1.2.2.3~7 と同様の手順で行った。

Table 2**Primer sequences and oligonucleotides for the cloning of the HNF1 α expression plasmid**

Primer	Sequence (5' to 3')	
Cloning of the HNF1 α coding region		
	Forward	CAGTGTGGTGGAAATTATGGTTTCTAAACTGAGCCA
	Reverse	GCCACTGTGCTGGATTTACTGGGAGGAAGAGGC
Direct sequencing		
HNF1 α	Sense	AGCAGTTCACCCATGCAGG
T7	Sense	TTGTAATACGACTCACTATAG
BGH	Antisense	TAGAAGGCACAGTCGAGG

1.2.4 Luciferase assay

HK-2 細胞を 24 well-plate に播種して 24 時間培養した後、1.2.1.2 項の II および III に従って、1.2.2 項にて作製した reporter constructs、pGL4.70 plasmid および 1.2.3 項で作製した HNF1 α expression plasmid を導入した。48 時間後、Dual-Luciferase[®] Reporter Assay Kit に従って cell lysate を調節した。ルシフェラーゼ活性の測定には TD-20/20 Luminometer を使用し、reporter constructs に起因する *Firefly* luciferase activity (#1) および pGL4.70 に起因する *Renilla* luciferase activity (#2) を測定した。Relative luciferase activity は各 reporter construct 導入群の #1/#2 で算出される ratio を、pGL4.10 導入群の ratio で標準化することで導出した。

1.2.5 RNA 抽出および mRNA の定量**1.2.5.1 RNA isolation**

ISOSPIN Cell & Tissue RNA に従って、ヒト腎組織および HK-2 細胞の total RNA を抽出した。腎組織は 20 mg を使用し、血液などの夾雑物を除去するために予め 1 \times PBS で wash を行った。また、腎組織のホモジナイズには POLYTRON を使用した。

1.2.5.2 Nascent RNA capturing

Nascent RNA を回収するサンプルでは、TSA 処理と同時に、0.2 mM 5-ethynyl uridine (EU) を含む培地にて 24 時間培養し、1.2.5.1 項と同様に total RNA を回収した。Total RNA 1 µg を用いて、Click-iT® Nascent RNA Capture Kit に従い、EU-labeled RNA を回収した。0.5 mM biotin azide を用いて Click 反応を行った後、精製した biotinylated RNA 200 ng を Dynabeads MyOne Streptavidin T1 magnetic beads 15 µL と結合させ、磁気分離によって nascent RNA を回収した。

1.2.5.3 cDNA synthesis

Verso cDNA Synthesis Kit に従って、抽出した RNA の逆転写反応を行い、cDNA を作製した。ネガティブコントロールとして、Verso Enzyme Mix(-) および RNA template (-) も同時に調製した。Nascent RNA では beads の沈降を防ぐため、96-well plate を振盪させながら逆転写反応を行い、cDNA を合成させた。反応後、95°C で 2 分間加熱し、逆転写反応を停止させると同時に beads と cDNA を乖離させた後、磁気分離にて beads を除去した。

[Reagents]

	Total	Nascent
5×cDNA synthesis Buffer	2 µL	4 µL
dNTP Mix (5 mM)	1 µL	2 µL
Anchored Oligo-dT (500 ng/µL)	0.5 µL	1 µL
Random Hexamer (400 ng/µL)	0.5 µL	1 µL
Verso Enzyme Mix	0.5 µL	1 µL
RNA template	500 ng	11 µL
Nuclease-free water		-
Total	10 µL	20 µL

[Thermal cycling conditions]

cDNA synthesis	42°C	60 min
Inactivation	95°C	2 min

1.2.5.4 Quantitative PCR

調製した cDNA を用い、StepOnePlus Real-Time PCR System によって SGLT2 mRNA の相対定量を行った。Threshold は 1.0 として threshold cycle (Ct) を算出した。RPL13 mRNA 発現量を内部標準として使用し、 $\Delta\Delta C_t$ 法にて relative SGLT2 mRNA expression level を算出した。mRNA の定量に使用したプライマーは Table 3 に示す。

[Reagents]

SYBR [®] Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus)	5 μ L
ROX Reference Dye	0.2 μ L
Primer mix (10 μ M)	0.2 μ L
DNA	1 μ L
Nuclease-free water	3.6 μ L
Total	10 μ L

[Thermal cycling conditions]

Initial denaturation	95°C	2 min	} 40 cycles
Denaturation	95°C	3 s	
Annealing and Extension	60°C	30 s	
Dissociation	95°C	15 s	
	60°C	1 min	
	95°C	15 s	

Table 3

Primer sequences for quantitative PCR

Gene		Sequence (5' to 3')	Position
SGLT2	Forward	TTCAGTCTCCGGCATAGCAA	1700 to 1719
	Reverse	CATCTCCATGGCACTCTCTGG	1807 to 1787
RPL13	Forward	GAGACAGTTCTGCTGAAGAAGTAA	486 to 510
	Reverse	TCCGGACGGGCATGAC	551 to 536

1.2.6 Nucleosome occupancy and methylome sequencing

SGLT2 5'-FR のヌクレオソーム占有状態および DNA メチル化状態を解析するために nucleosome occupancy and methylome sequencing (NOMe-Seq) を行った。この実験では始めに、細胞や組織のタンパク質-DNA 結合を固定化し、超音波処理にて断片化した後、ヒト生体内に存在しない GpC methyltransferase を使用することで、GpC sites の人工的なメチル化処理を行う。GpC methyltransferase は立体障害性を強く受けるため、ヒストンや転写因子といったタンパク質に隣接する GpC sites に接近することができず、空間的に開いている領域の GpC sites のみをメチル化する。そのため、GpC sites のメチル化状態を解析することでヌクレオソームを構成する領域を推定することができる。メチル化反応後は、脱クロスリンク反応にて固定化を解除し、バイサルファイト変換にて非メチル化状態のシトシン残基をウラシル残基へと変換した。Bisulfite-converted DNA を鋳型に PCR を行い、cloning および sequencing によって *SGLT2* 5'-FR の配列情報を回収した。ヌクレオソームは約 147 bp の DNA で構成されるため、147 bp 以上に渡って GpC メチル化の認められない領域がヌクレオソーム占有状態にあると推測される。従って、得られた配列情報から各 GpC sites のメチル化状態を解析することにより、*SGLT2* 5'-FR におけるヌクレオソーム占有状態を推定した。また、同時に GpC methyltransferase (-) を調整し、CpG sites のメチル化状態を解析することで内在性 DNA メチル化状態を確認した。本実験の概念図を以下に示す (Fig. 2)。

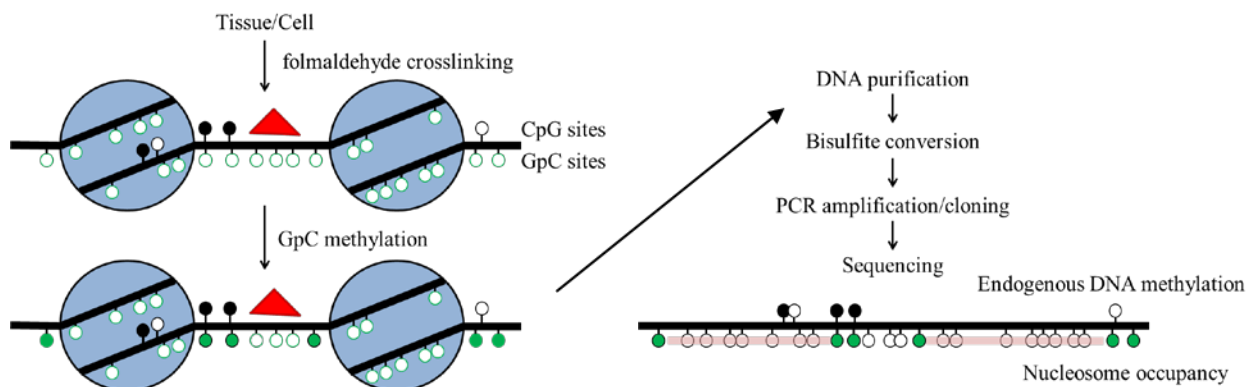


Fig. 2 Scheme of the NOMe-Seq assay

Upper circles represent CpG sites: white circle, unmethylated CpG site; black circle, methylated CpG site). Lower green circles represent GpC sites: unfilled circle, unmethylated GpC site; filled circle, methylated GpC site indicated that is accessible to GpC methyltransferase. Pink lines represent regions large enough to accommodate a nucleosome.

1.2.6.1 Preparation of GpC-methylated and bisulfite-converted DNA

NOMe-Seq の Step A~F に従って、固定化処理、超音波処理、GpC メチル化、脱クロスリンク反応およびバイサルファイト変換を行った。ホモジナイズには Potter-Elelhem Tissue Glinder を用いた。ヒト腎組織については 12.5 mg を PBS 1 mL で 2 回 wash した後、1% formaldehyde 1 mL を加え、固定化処理は氷上にて 15 分間行った。PBS 1 mL で 1 回 wash し、1× Glycine 500 μ L を加え、氷上で 5 分間静置して固定化処理を停止させた。ホモジナイズ後には、75 μ m nylon mesh を用いて組織片などの夾雑物を除去し、Step B.3 以降は NOMe-Seq protocol に従った。超音波処理には BIORUPTOR UCD-200 を用いて、Power, high の条件で (On, Off) = (30 s, 30 s) を 5 cycles 行った。GpC メチル化反応後の脱クロスリンク反応は 95°C で 15 分間行った。バイサルファイト変換は 94°C で 3 分間加熱させた後、50°C で 9 時間行った。

1.2.6.2 PCR

バイサルファイト変換された *SGLT2* 5'-FR の配列からプライマー (Table 4) を設計し、AmpliTaq Gold[®] DNA polymerase を用いて PCR を行った。

[Reagents]

Sterile distilled water	16.625 μ L
10×PCR buffer II	2.5 μ L
25 mM MgCl ₂	2.5 μ L
2 mM dNTPs	1.5 μ L
mixed primers (10 μ M)	0.625 μ L
AmpliTaq Gold [®] DNA polymerase	0.25 μ L
Bisulfite-converted DNA	1 μ L
<hr/>	
Total	25 μ L

[Thermal cycling conditions]

Initial denaturation	95°C	5 min	} 45 cycles
Denaturation	95°C	30 s	
Annealing	58.7°C	30 s	
Extension	72°C	30 s	
Final extension	72°C	5 min	

1.2.6.3 TA-cloning

T4 DNA Ligase を用いて、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up にて精製した PCR product を p-GEM®-T Easy Vector に導入した。Blue-white screening によるベクターへの PCR product の導入予測を行うために、予め isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 50 μL, 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside (X-gal) 10 μL を塗り広げた LB agar を使用して JM109 を培養した。p-GEM®-T Easy Vector 配列上の T7 promoter および SP6 promoter を認識するプライマーを用いて (Table 4)、1.2.2.5 項と同様の手順にて、ベクターへの目的配列の導入を確認した。

• Ligation

[Reagents]

2× Rapid Ligation Buffer	5 μL
T4 DNA Ligase (1-3 U/μL)	1 μL
p-GEM®-T Easy Vector	0.2 μL
Purified PCR product	3.8 μL
<hr/>	
Total	10 μL

[Thermal cycling conditions]

Ligation	16°C	60 min
----------	------	--------

1.2.6.4 Direct sequencing

1.2.2.7 項と同様の手順にて、T7、SP6 プライマー (Table 4) を用いて、PCR product の配列を確認した。

[Reagents]

BigDye® Terminator v1.1 v3.1 5×Sequencing Buffer	2 μL
Terminator Ready reaction mix®	0.33 μL
Primer (10 μM)	0.4 μL
PCR product	1 μL
Nuclease-free water	6.27 μL
<hr/>	
Total	10 μL

[Thermal cycling conditions]

1.2.2.7 項参照

1.2.6.5 Data analysis

配列編集ソフトウェア BioEdit Sequence Alignment Editor および統計解析ソフトウェア R を使用して、得られた配列情報より、GpC および CpG sites のメチル化解析を行った。GpC sites のメチル化が 147 bp 以上連続して認められない領域をヌクレオソーム占有領域として推定した。GpC sites へのメチル化が十分に行われているかについては、*GAPDH* 5'-FR における GpC メチル化状態を解析することで確認した。

Table 4

Primer sequences for NOME-Seq

Primer		Sequence (5' to 3')	Position
Bisulfite PCR			
SGLT2	Forward	TGGGAAAGGATTTTTGATTTTTTTT	-477 to -454
	Reverse	CCCCTAAATCCCCCAAAAA	-14 to -33
GAPDH	Forward	GGGTTTTTGTTTTGATTTTTTAGTGTTT	-220 to -192
	Reverse	CAATCCCAGCCCAAAATCTTAAA	+25 to +3
Insert check and direct sequencing			
T7	Forward	TTCAGTCTCCGGCATAGCAA	
SP6	Reverse	CATCTCCATGGCACTCTCTGG	

1.2.7 Nucleosome scanning assay

NOMe-Seq とは異なる方法にて *SGLT2* 5'-FR のヌクレオソーム占有状態を解析するために、ヌクレオソームを構成する DNA (nucleosomal DNA) を回収して、ヌクレオソーム占有状態を定量的に解析する nucleosome-scanning assay (NuSA) を行った。Nucleosomal DNA の回収には micrococcal nuclease (MNase) を使用した。MNase はヌクレオソームを構成していない領域の DNA (linker DNA) を選択的に切断する特徴を有した制限酵素であるため、MNase 処理後に断片化した linker DNA を除去することで、nucleosomal DNA のみを回収することが可能である。精製した DNA を用いて、quantitative PCR を行うことで目的の領域におけるヌクレオソーム占有状態を定量的に解析することができる。本研究では、コントロールとして MNase 未処理群 (genomic DNA) も同時に調製した。*SGLT2* 5'-FR 上に多数のプライマーを作製し、quantitative PCR にて得られたデータを Pfaffl 法にて解析することでヌクレオソーム占有状態を定量的に評価した [34]。

1.2.7.1 Preparation of nucleosomal DNA

HK-2 細胞は 1.0×10^6 cells/sample となるように回収し、Episcope® Nucleosome Preparation Kit に従って、nucleosomal DNA および genomic DNA を調製した。ヒト腎組織は 10 mg/sample で使用し、概ねプロトコルに従ったが、操作が異なる点について以下に示した。

- 1) Cytoplasmic Lysis Buffer を加えて氷上で 10 分間静置した後、Potter-Sleghjem Tissue Glinder を用いてホモジナイズを行い、75 μm nylon mesh でろ過を行った。
- 2) $1 \times$ Micrococcal Nuclease Buffer 55 μL を加えて十分に懸濁した後に遠心 (4°C, 500 rpm, 3 min) を行い、上清 50 μL を回収した。

1.2.7.2 Quantitative PCR

Nucleosomal DNA および genomic DNA を用いて real-time PCR を行い、Pfaffl 法にて *SGLT2* 5'-FR のヌクレオソーム占有率を定量した。プライマーは *SGLT2* 5'-FR 上に 20-60 bp の間隔で 110-170 bp を増幅するように作製した (Table 5)。内部標準には Episcope® Nucleosome Preparation Kit に付属のプライマ

一にて増幅する *LINE1* を使用した。反応条件については 1.2.5.4 項を参照。

Table 6

Primer sequences for the NuSA

Position		Sequence (5' to 3')	Midpoint
-547 to -522	Forward	TTTGGTGGGGATAAAATATCTGGTCA	-462
-377 to -400	Reverse	TCTTCAGCCTGATTTCCAATCCTG	
-508 to -487	Forward	GCAAAAATCTGGGCTGGGTAGG	-445
-383 to -405	Reverse	GCCTGATTTCCAATCCTGGTCAT	
-454 to -430	Forward	CTAGATTTGGTTTGGAGAAGCAGGG	-381
-309 to -334	Reverse	TTTCAAATCCAAGTCTGACAGGGTC	
-419 to -402	Forward	GCGGGAATTGGGGCATGA	-353
-287 to -318	Reverse	TTAACTAATCCAGAGGAATCATTTTCAAATC	
-365 to -342	Forward	GAGCTATGGAGGGTTCCTGAGGAG	-289
-214 to -237	Reverse	TGCTCCAGGCTCAAAATCACTCTT	
-316 to -287	Forward	TTTGAAAATGATTCCTCTGGATTAGTTAAA	-258
-200 to -217	Reverse	CGCCCTCTCCCCTGTGCT	
-316 to -287	Forward	TTTGAAAATGATTCCTCTGGATTAGTTAAA	-236
-157 to -179	Reverse	GCCCTTCCAAGTTCAAGAGCACT	
-237 to -214	Forward	AAGAGTGATTTTGAGCCTGGAGCA	-170
-104 to -131	Reverse	TGTTTAGCTGAATCAGGTCATATCAAGG	
-181 to -158	Forward	AGAGTGCTCTTGAACCTGGAAGGG	-123
-65 to -84	Reverse	CCGACAAGTCCCCCAGGTCT	
-144 to -120	Forward	GACCAGCCTTCAGCCTTGATATGAC	-69
+6 to -13	Reverse	CCCATCCAGGAACCAGCC	
-91 to -71	Forward	GGGAATGAGACCTGGGGGACT	-25
+41 to +20	Reverse	CTGCCTCTGTGTGCTCCTCCAT	
-17 to +1	Forward	GGGGCTGGTTCCTGGATG	+51
+119 to +95	Reverse	GGAATATGCAGCAATGACTAGGAT	
+3 to +23	Forward	GGCAGATCCTGGGGAGAATGG	+74
+144 to +124	Reverse	CACAAGCCAACGCCAATGACC	

1.2.8 Chromatin immunoprecipitation assay

細胞中の *SGLT2* 5'-FR のヒストンアセチル化状態および HNF1 α の結合頻度を確認するため、EpiQuik Chromatin immunoprecipitation (ChIP) Kit および EpiQuik Tissue ChIP Kit に従って ChIP assay を行った。始めに、細胞や組織のタンパク質-DNA 結合を固定化し、超音波処理にて断片化した後、アセチルヒストン H3 および HNF1 α を認識する抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降後に残った DNA を回収し、semi-quantitative PCR および quantitative PCR にて *SGLT2* 5'-FR におけるヒストンアセチル化状態および HNF1 α 結合頻度を定量的に解析した。

1.2.8.1 Chromatin shearing

HK-2 細胞およびヒト腎組織を回収し、1 \times PBS で wash した後、1% formaldehyde を加えて細胞内のタンパク質-DNA 構造の固定化を行った。1.25 M glycine にて反応を停止させ、再度 1 \times PBS で wash した。Lysis buffer を加えて数分おきに vortex しながら 30 分間氷上で静置した後、Power, high の条件で (On, Off) = (30 s, 30 s), 20 cycles にて超音波処理を行い、chromatin を 300-600 bp 程度に切断した。遠心後の上清のうち、5 μ L を Input として使用し、残りを免疫沈降に使用した。HK-2 細胞およびヒト腎組織の反応条件および試薬量については以下に示す。

[Reagents and reaction conditions]

Sample	HK-2 cells	Kidney
Fixation duration	5 min	15 min
1.25 M glycine	1 mL	111 μ L/40 mg
CP3A (Pre-Lysis Buffer)	200 μ L/1.0 \times 10 ⁶ cells	-
CP3B (Lysis Buffer)	50 μ L/1.0 \times 10 ⁶ cells	-
Homogenizing Buffer	-	200 μ L/40 mg
CP3 (Lysis Buffer)	-	50 μ L/20 mg
(Number or volume)/antibody	1.0 \times 10 ⁶ cells	20 mg

1.2.8.2 Immunoprecipitation and DNA purification

Anti-acetyl-Histone H3 (Lys9) Antibody、HNF-1 α Antibody (F-7) および anti-mouse IgG (negative control) 2 μ g を strip well に加え、100 rpm にて 1 分間浸透した後、室温にてそれぞれ 90、150、90 分間静置した。

各 kit の protocol に従って、免疫沈降反応 (90 min, 100 rpm) を行い、immunoprecipitated DNA および input DNA を回収した。

1.2.8.3 Semi-quantitative PCR

Immunoprecipitated DNA を鋳型として、*SGLT2* 5'-FR を増幅させるプライマー (Table 6) を設計し、Gene RED PCR Mix Plus を用いて PCR を行った。PCR product 8 μ L を用いてアガロースゲル電気泳動を行い、Lumino Image Analyzer LAS-3000 および Multi Gauge を用いて、バンド強度を数値化した。各 input DNA のバンド強度を 1 とし、AcH3 enrichment を算出した。

[Reagents]

Gene RED PCR Mix Plus	5 μ L
Forward primer (10 μ M)	0.12 μ L
Reverse primer (10 μ M)	0.12 μ L
Immunoprecipitated DNA	0.5 μ L
Nuclease-free water	4.26 μ L
Total	10 μL

[Thermal cycling conditions]

Initial denaturation	94°C	3 min	} 35 or 33 cycles
Denaturation	94°C	20 s	
Annealing	60°C	20 s	
Extension	72°C	5 s	
Final extension	72°C	7 min	

1.2.8.4 Quantitative PCR

Immunoprecipitated DNA を鋳型に、*SGLT2* 5'-FR (-144/+26) に作製したプライマー (Table 6) を用いて real-time PCR を行った。Input DNA の Ct を 1 とし、AcH3 enrichment および relative binding level を算出した。免疫沈降反応が十分に行われているかの確認は、kit に付属の GAPDH primers を用いて行った。反応条件については 1.2.5.4 項を参照

Table 6**Primer sequences for ChIP assays**

Name		Sequence (5' to 3')	Position	Cycles
Semi-quantitative PCR				
Distal	Forward	TTTGGTGGGGATAAAATATCTGGTCAA	-547 to -521	35
	Reverse	TGTGCTCCAGGCTCAAATCACTC	-212 to -235	
Proximal	Forward	AGACCAGCCTTCAGCCTTGATATGA	-145 to -121	33
	Reverse	ACGCCAATGACCAGCAGGAAATA	+135 to +113	
Quantitative PCR				
	Forward	GACCAGCCTTCAGCCTTGATATGACC	-144 to -119	
	Reverse	CCTCCATTCTCCCCAGGATCTGC	+26 to +4	

1.2.9 Western blot analysis**1.2.9.1 Preparation of lysate from HK-2 cells**

回収した HK-2 細胞を 1× PBS で wash した後、さらに 1× PBS を加えセルスクレイパーを用いて細胞をプレートから剥がし、遠心 (4°C, 10,000 rpm, 1 min) して上清を除去した後、radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer [10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40, and 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)] および 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を加え、ニードルを用いて cell lysate を作製した。再度、遠心 (4°C, 14,000 rpm, 30 min) して上清を回収した。

1.2.9.2 Preparation of lysate from the human kidney

腎組織 10 mg に RIPA buffer、1 mM PMSF およびセラミックビーズを加え、Qiagen Mixer Mill MM300 を用いて cell lysate を抽出した。遠心 (4°C, 14,000 rpm, 30 min) して上清を回収した。

1.2.9.3 Determination of protein concentration

Protein Assay Bicinchoninate Kit に従い、BCA reagent A : B = 50 : 1 で混和して working reagent を調製した。96-well plate に standard solution (25, 50, 125, 250, 500 and 1000 µg/mL) および 10 倍希釈した lysate をそれぞれ 25 µL 加え、working reagent 200 µL を加えた。30 秒間振盪し、37°C で 30 分間静置した後にそ

それぞれの吸光度 (562 nm) を測定した。Standard solution の蛍光から検量線を作成し、各 lysate のタンパク質濃度を算出した。

1.2.9.4 SDS-PAGE

総タンパク質量が 10 µg となるように loading sample を調製し、95°C で 5 分間加熱してタンパク質を変性させた。前日に作製した 9% SDS polyacrylamide gel を泳動層に固定し、running buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, and 0.1% SDS) で満たした。調整した loading sample および泳動マーカをゲルにアプライし、20 mA で泳動を始め、分離層 (lower gel) に到達してからは 30 mA で泳動した。

• Loading samples

6× loading dye	4 µL
Protein	10 µg
Sterile distilled water	
<hr/>	
Total	24 µL

• 9% SDS polyacrylamide gel

	Upper	Lower
Sterile distilled water	3.0 mL	4.35 mL
30% acrylamide mix	0.6 mL	3.0 mL
0.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	1.25 mL	-
1.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	-	2.5 mL
SDS	50 µL	100 µL
Ammonium peroxodisulfate (APS)	32.5 µL	100 µL
UltraPure™ TEMED	10 µL	10 µL

1.2.9.5 Blotting and blocking

Immobilon-P PVDF Membrane をメタノール 10 mL に 30 秒間浸した後、blotting buffer (100 mM Tris and 192 mM glycine) を加えて membrane を振盪させた。泳動終了後、ゲルを blotting buffer で振盪させた。Semi-dry blotting 法にてゲルから membrane への転写を行った。転写には Trans-Blot® SD Semi-dry Transfer Cell を使用し、200 mA で 60 分間通電した。転写中に PBST (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, and 0.5% Tween® 20) および blocking buffer (5% skim milk-PBST) を調製した。

転写後は、membrane の不要な部分を切り捨て、blocking buffer を加えて 20 分間振盪した。

1.2.9.6 Antibody staining

Blocking buffer を捨て、PBST で 3 回 wash した後、HNF-1 α antibody (F-7) および anti- β actin antibody を用いて、振盪 (4°C、70 rpm, overnight) しながら一次抗体反応を行った。反応終了後、1% skim milk-PBST で 3 回 wash し、ECL Mouse IgG, HRP-linked whole Ab を用いて、室温で遮光しながら 1 時間二次抗体反応を行った。抗体の希釈には Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution を使用し、希釈倍率はそれぞれ anti-HNF1 α antibody, 1:2000; anti- β actin antibody, 1:5000; ECL Mouse IgG, HRP-linked whole Ab, 1:10000 とした。

1.2.9.7 Imaging

1% skim milk-PBST で 3 回、PBST で 1 回 wash し、ECL Select Western Blotting Detection System のプロトコルに従って化学発光を増強させ、Lumino Image Analyzer LAS-3000 にて membrane 上の HNF1 α および β -actin の撮像を行った。

1.2.10 統計解析

有意差検定には統計解析ソフトウェア R を用いて行った。独立した 2 群間の平均値の比較には、F 検定による等分散性を確認した後、Student's *t*-test もしくは Welch's *t*-test にて統計解析を行った。多群間の平均値の比較には、Tukey-Kramer test を行った。有意水準は 5%とした。

1.3 結果

1.3.1 HK-2 細胞における *SGLT2* 5'-FR の転写活性および *SGLT2* mRNA 発現量の定量

ヒト *SGLT2* は腎近位尿細管のセグメント S1 および S2 に特異的に発現している。HK-2 細胞は健康成人の腎近位尿細管上皮細胞を由来とした細胞株であり、ヒト腎近位尿細管細胞モデルとして広く使用されている [35, 36]。そこで本研究では、HK-2 細胞を用いてヒト腎臓における *SGLT2* 遺伝子の転写調節機構を解析することとした。

始めに、HK-2 細胞における *SGLT2* 5'-FR の転写活性の評価を行った。*SGLT2* 5'-FR reporter constructs (-3185/+18, -2320/+18, -1587/+18, -485/+18, -154/+18 and -44/+18) および pGL4.10 (control) を HK-2 細胞に導入し、luciferase assay にて *SGLT2* 5'-FR の転写活性を定量した。2 種の constructs (-3185/+18 and -154/+18) 導入群では pGL4.10 導入群に対してわずかな luciferase activity の増加傾向を示したが、いずれも有意な増加は認められなかった (Fig. 3a)。そこで、HK-2 細胞および近位尿細管を含むヒト腎臓皮質 (Kidney) における *SGLT2* mRNA 発現量を quantitative PCR にて解析した。Kidney と比べ、HK-2 細胞の *SGLT2* mRNA 発現量は極めて低いことが明らかとなった (Fig. 3b)。以上の結果より、HK-2 細胞はヒト腎組織に比べ、十分な *SGLT2* の転写活性を有していないことが示唆される。

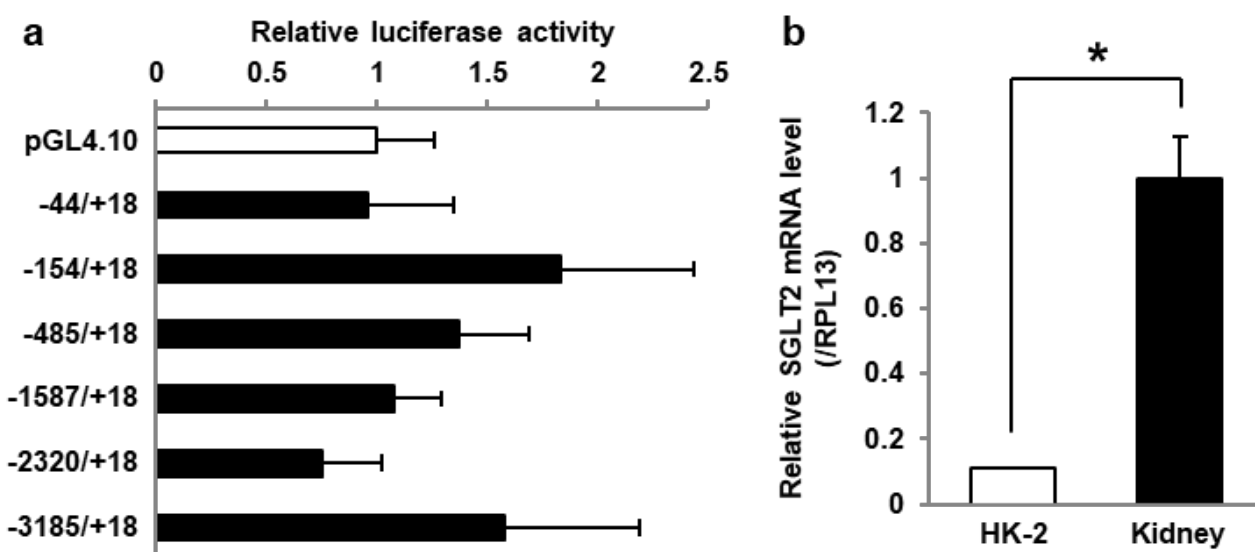


Fig. 3 Analysis of transcriptional activity of *SGLT2* 5'-FR and *SGLT2* mRNA levels in HK-2 cells

(a) Luciferase activity of a series of reporter constructs containing *SGLT2* 5'-FR in HK-2 cells. Results are expressed as fold increases in pGL4.10. (b) *SGLT2* mRNA levels in HK-2 cells and the human kidney were measured by quantitative PCR and normalized to RPL13 mRNA levels. Results are expressed relative to *SGLT2* mRNA levels in the human kidney. Results represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$.

1.3.2 HK-2 細胞およびヒト腎組織における *SGLT2* 5'-FR のヌクレオソーム占有解析

HK-2 細胞とヒト腎組織で *SGLT2* の転写活性が大きく異なることが示唆されたことから、HK-2 細胞とヒト腎組織との間に異なる *SGLT2* 遺伝子発現調節機構が存在することが推測される。本研究では、エピジェネティック制御に着目し、*SGLT2* 5'-FR におけるヌクレオソーム占有状態を解析するために NOME-Seq および NuSA を行った。NOME-Seq では、ヌクレオソームや転写因子などのタンパク質が結合していない領域の GpC dinucleotides を特異的にメチル化することで、ヌクレオソーム占有状態の解析を行った。ヌクレオソームは約 147 bp の DNA で構成されるため、*SGLT2* 5'-FR において 147 bp 以上連続して GpC メチル化を受けていない領域をヌクレオソーム占有状態であると推定し、グレーの線で示した。転写開始点から約 300 bp 上流までの範囲における GpC メチル化状態は HK-2 細胞とヒト腎組織で大きく異なっており、HK-2 細胞では同領域に高度なヌクレオソーム占有状態が認められた (Fig. 4a)。NuSA ではヌクレオソームを構成する DNA のみを回収し、quantitative PCR にて *SGLT2* 5'-FR におけるヌクレオソーム占有状態の定量的な解析を行った。ヒト腎組織と比較して、HK-2 細胞では *SGLT2* 5'-FR におけるヌクレオソーム占有率が高く、転写開始点から 200 bp 上流までの範囲においては、顕著なヌクレオソーム占有状態が認められた (Fig. 4b)。以上の結果より、ヒト腎組織と比較して、HK-2 細胞の *SGLT2* 5'-FR はヌクレオソームによって高度に占有されていることが明らかとなった。

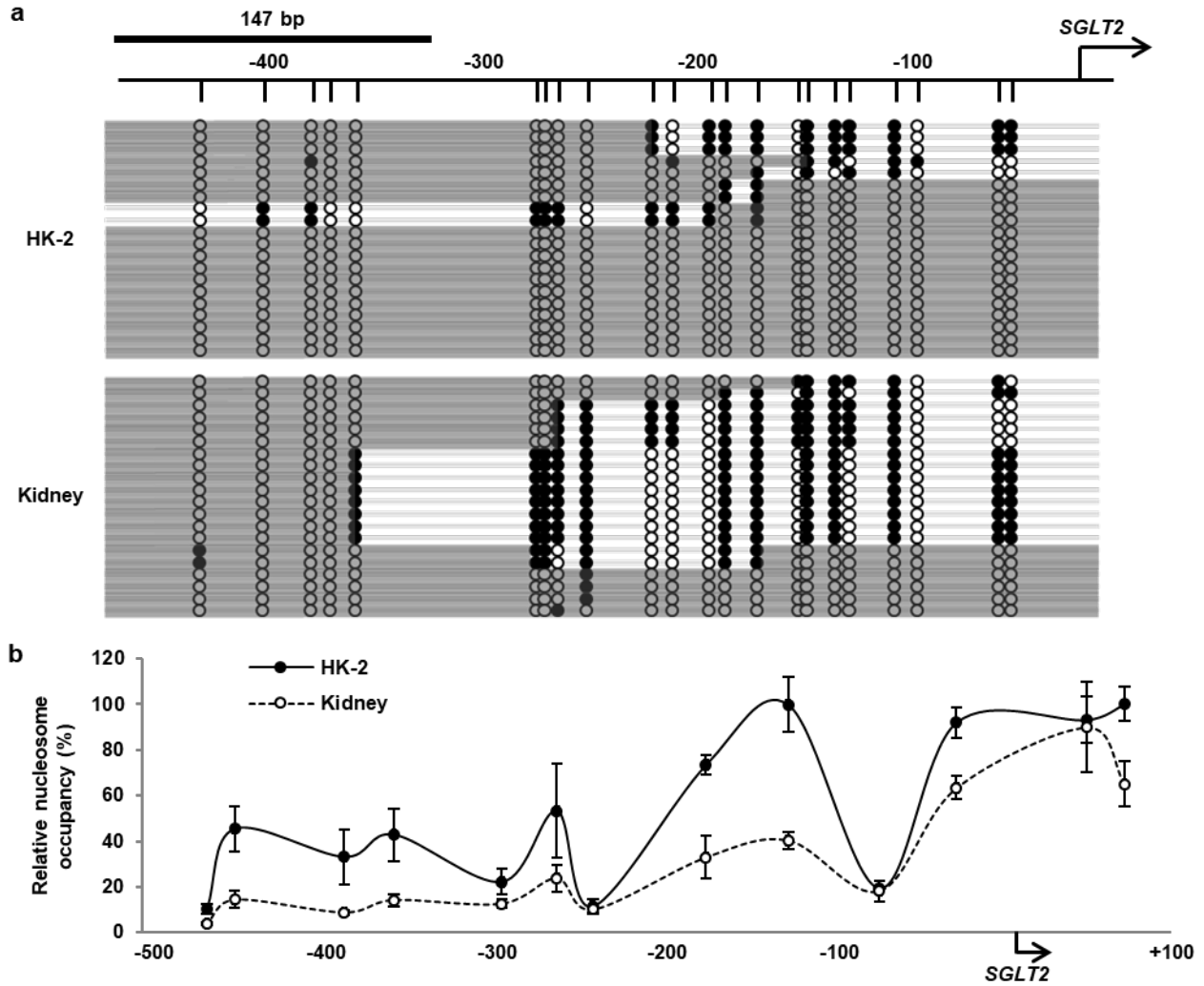


Fig. 4 Analysis of nucleosome occupancy in *SGLT2* 5'-FR in HK-2 cells and the human kidney

(a) NOME-Seq data of *SGLT2* 5'-FR in HK-2 cells and the human kidney. The arrow indicates the *SGLT2* TSS. Vertical lines indicate GpC sites. White circles represent unmethylated GpC sites and black circles represent methylated GpC sites. Gray bars represent nucleosome occupancy, which is the region of consecutive unmethylated GpC sites over 147 bp.

(b) NuSA data of 5'-FR in HK-2 cells (black circles) and the human kidney (white circles). Relative nucleosome occupancy is expressed relative to the level of nucleosome occupancy in each sample without the MNase treatment and indicated by the midpoints of each amplicon. Results represent the mean \pm SD of three independent experiments.

1.3.3 TSA 処理による SGLT2 発現および SGLT2 5'-FR のヌクレオソーム占有状態への影響

ヒストンアセチル化は遺伝子発現に重要な領域のヌクレオソーム占有状態を変動させることで遺伝子発現の活性化に寄与するエピジェネティック制御機構であり、生体内では histone acetyltransferases (HATs) による亢進、および、histone deacetylases (HDACs) による抑制を受けている。HDAC inhibitors (HDACi) はヒストンアセチル化を促進することで遺伝子発現を変動させる機能を有する。そこで本研究では、*in vitro* 実験系にて広く使用されている HDACi である TSA を HK-2 細胞に曝露し、ヒストンアセチル化が SGLT2 mRNA 発現量および SGLT2 5'-FR におけるヌクレオソーム占有状態に及ぼす影響を評価した。

TSA 処理による SGLT2 mRNA 発現量への影響を評価した結果、DMSO 処理群 (control) と比較して、TSA 処理群では HK-2 細胞内の SGLT2 mRNA 発現量の有意な増加を認めた (Fig. 5a)。SGLT2 5'-FR におけるヒストンアセチル化への影響は、anti-AcH3 antibody を用いた ChIP assay にて行った (Fig. 5b-d)。解析の結果、DMSO 処理群と比較して、proximal 領域 (-145/+135) では TSA 処理によって有意なヒストン H3 のアセチル化の促進を認めた。一方で、distal 領域 (-547/-212) では有意な変化は認められなかった。TSA 処理による SGLT2 5'-FR のヌクレオソーム占有状態への影響を NOMe-Seq および NuSA により評価した (Fig. 6)。いずれのヌクレオソーム解析の結果からも、TSA 処理によって、転写開始点から約 300 bp 上流の範囲においてヌクレオソーム占有率の減少が認められた。一方で、約 300 bp より上流ではヌクレオソーム占有状態の変動は認められなかった。以上の結果から、TSA 処理によってヒストンアセチル化が促進することにより、HK-2 細胞の SGLT2 mRNA 発現量が増加し、転写開始点から約 300 bp までの範囲におけるヌクレオソーム占有率が減少することが示唆された。

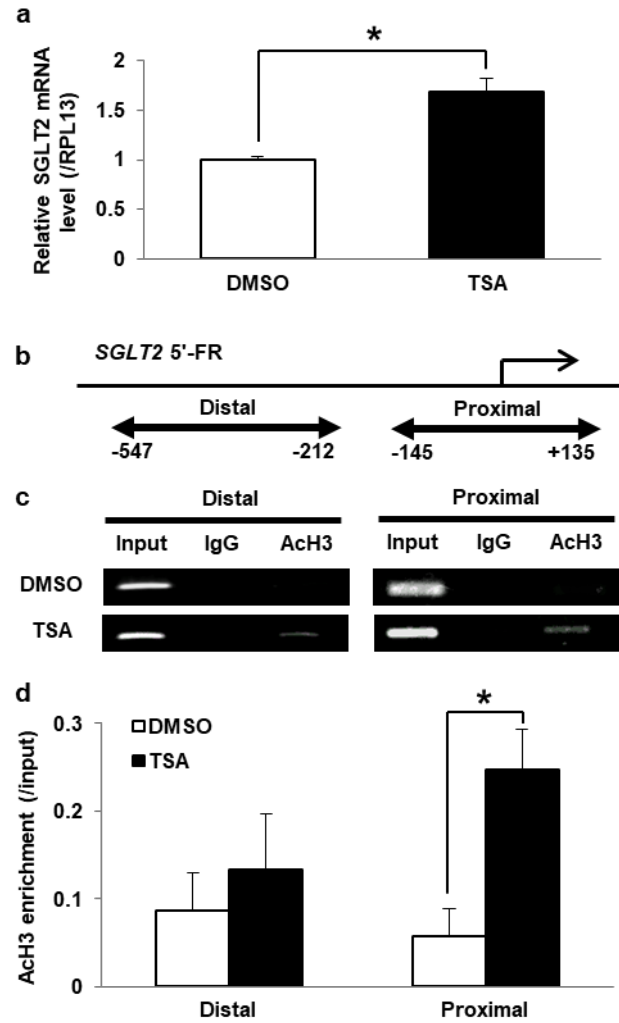


Fig. 5 Influence of the TSA treatment on *SGLT2* expression and histone acetylation in *SGLT2* 5'-FR in HK-2 cells
 HK-2 cells were treated with DMSO or TSA for 24 hours. **(a)** *SGLT2* mRNA levels were measured by quantitative PCR and normalized to RPL13 mRNA levels. Results are expressed relative to *SGLT2* mRNA levels in DMSO-treated cells (control). **(b)** Scheme of the ChIP assay in *SGLT2* 5'-FR. The upper arrow indicates the *SGLT2* TSS. Lower arrows indicate two sets of PCR primers targeting 5'-FR, designated as distal and proximal. **(c)** ChIP analyses targeting 5'-FR in DMSO- or TSA-treated cells using the antibody against AcH3. **(d)** Semi-quantitative analyses of AcH3 enrichment in two regions in ChIP analyses in **(c)**. Results are expressed as the percentage of the immunoprecipitate over total input DNA. Results represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$.

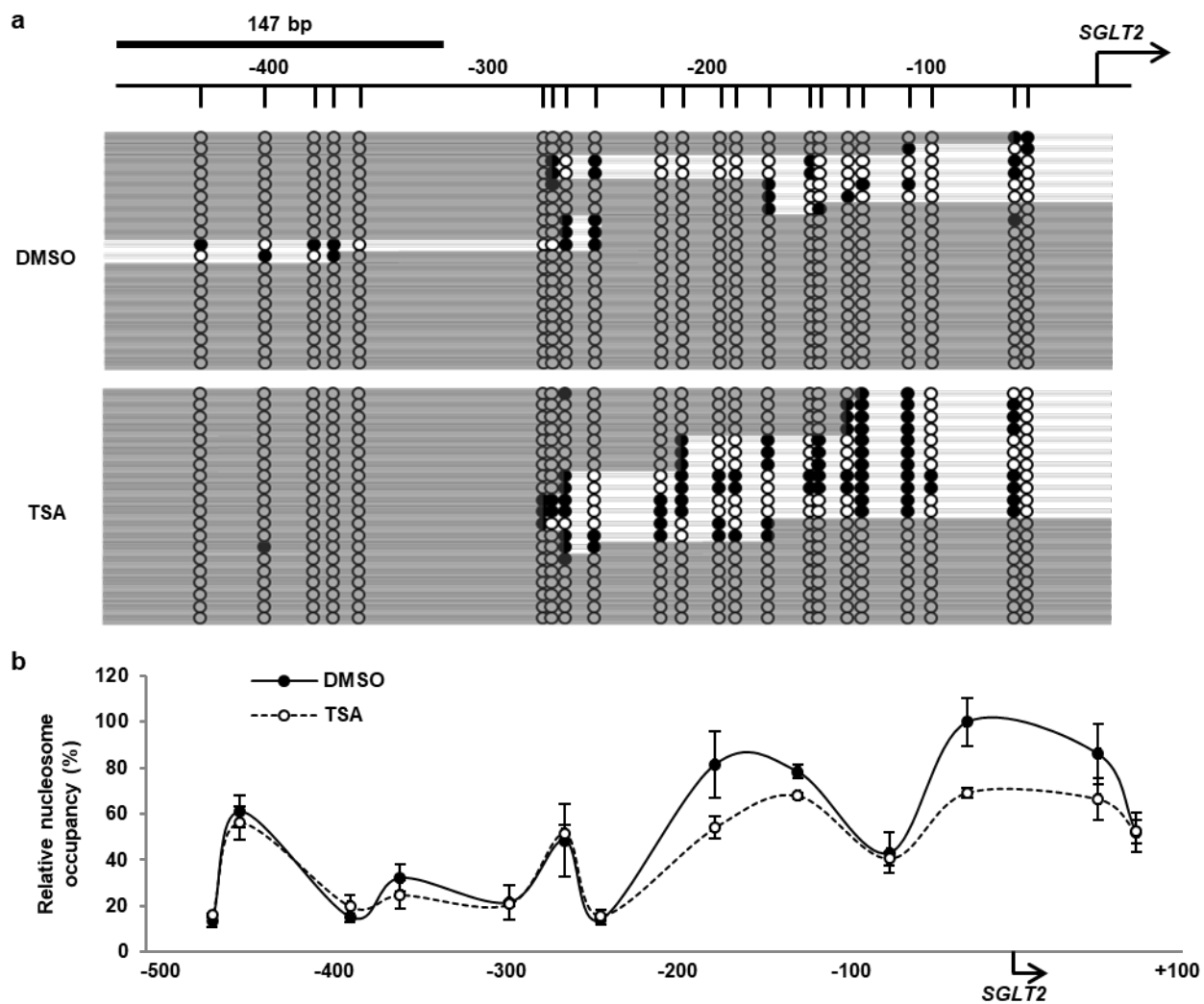


Fig. 6 Influence of the TSA treatment on nucleosome occupancy in *SGLT2* 5'-FR in HK-2 cells

(a) NOME-Seq data of *SGLT2* 5'-FR in DMSO- or TSA-treated cells. Vertical lines indicate GpC sites. White circles represent unmethylated GpC sites and black circles represent methylated GpC sites. Gray bars represent nucleosome occupancy, which is the region of consecutive unmethylated GpC sites over 147 bp. (b) NuSA data of 5'-FR in DMSO- (black circles) or TSA-treated cells (white circles). Relative nucleosome occupancy is expressed relative to the level of nucleosome occupancy in each sample without the MNase treatment and indicated by the midpoints of each amplicon.

1.3.4 TSA 処理による HNF1 α 発現量および SGLT2 5'-FR への HNF1 α 結合頻度への影響

転写因子結合予測ソフトウェア Galaxy を使用し、SGLT2 5'-FR に結合する可能性のある転写因子の探索を行った。その結果、転写開始点から-51~-37 bp の範囲において、HNF1 α の結合が予測された。HNF1 α はヒト腎臓における SGLT2 遺伝子の転写調節因子として報告されている [22, 23]。HK-2 細胞中の HNF1 α タンパク質発現を western blot analysis にて解析したところ、DMSO および TSA 処理群のいずれにおいても、HK-2 細胞内の HNF1 α 発現は非常に低かった (Fig. 7a)。一方で、anti-HNF1 α antibody を用いた ChIP assay を行い、quantitative PCR にて予測された HNF1 α 結合領域への HNF1 α の結合頻度を解析したところ、TSA 処理によって HNF1 α 結合頻度の有意な増加が認められた (Fig. 7b)。またヒト腎臓組織においても、同領域への HNF1 α の結合が認められた (Fig. 7b)。

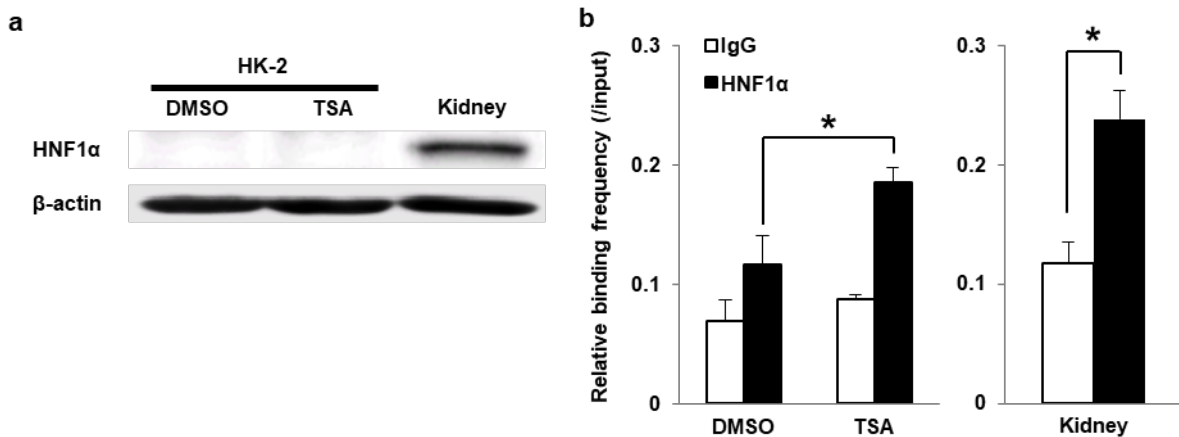


Fig. 7 Analysis of HNF1 α expression and HNF1 α binding frequency after the TSA treatment in HK-2 cells

(a) Western blot analyses representing HNF1 α and β -actin protein expression in DMSO- or TSA-treated HK-2 cells and the human kidney. (b) ChIP analyses with quantitative PCR targeting the HNF1 α -binding site in SGLT2 5'-FR in DMSO- or TSA-treated cells and the human kidney using antibodies against normal IgG (white bars) and HNF1 α (black bars). The relative binding frequency of HNF1 α was measured by quantitative PCR and normalized to that of the input. Results represent the mean \pm SD of three independent experiments. * P < 0.05.

1.3.5 HNF1 α 発現細胞における *SGLT2* 5'-FR の転写活性

HNF1 α と HNF1 α 結合予測領域 (-51/-37) の *SGLT2* 遺伝子転写における役割を明らかにするため、HNF1 α を一過性に発現させた HK-2 細胞を用いて luciferase assay を行った (Fig. 8)。まず、HNF1 α 翻訳領域を組み込んでいない HNF1 α negative control ベクター (pcDNA3.1) を導入した HK-2 細胞においては、*SGLT2* 5'-FR を組み込んだすべての reporter constructs において、*SGLT2* 5'-FR を組み込んでいない pGL4.10 導入群と比べて relative luciferase activity の有意な増加を認めなかった。HNF1 α 発現ベクターを導入した HK-2 細胞では、2 種の reporter constructs (-154/+18, -485/+18) 導入群において relative luciferase activity の有意な増加を認めた。一方で、-154/+18 および -485/+18 導入群では有意な luciferase 活性の相違は認められなかった。これらの reporter constructs は予測された HNF1 α 結合領域を含んでいるため、-485/+18 construct を鋳型に、同 HNF1 α 結合領域を欠失させた reporter construct [del(-51/-37)] を作製し、relative luciferase activity の定量を行った。その結果、del(-51/-37) 導入群では HNF1 α によって増加した活性の消失を認めた。以上より、転写開始点から-51 ~ -37 bp に予測された HNF1 α 結合領域が *SGLT2* 遺伝子の HNF1 α を介した転写の活性化に必須であることが示唆される。

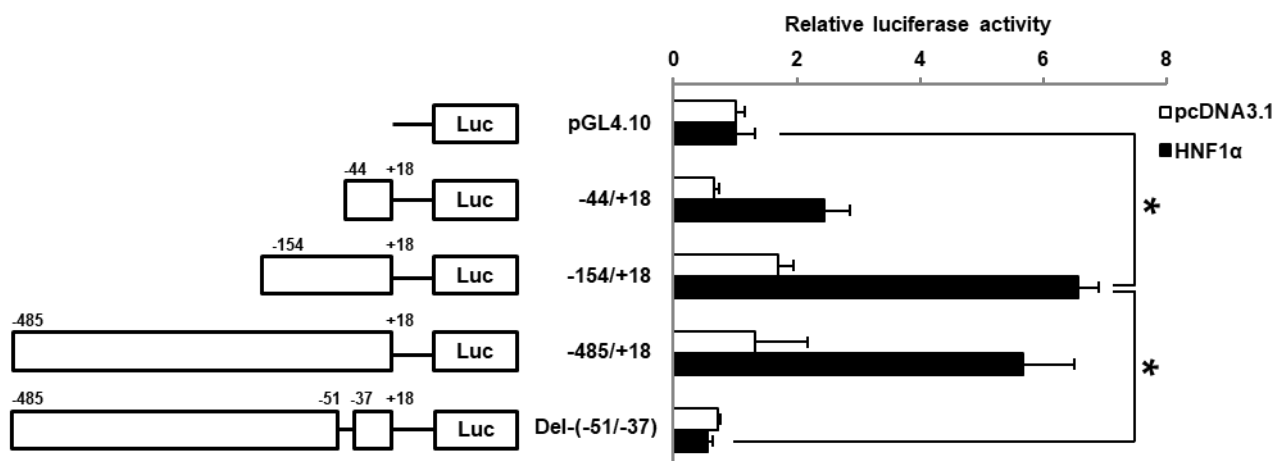


Fig. 8 Deletion analysis of *SGLT2* 5'-FR in HNF1 α -expressing HK-2 cells

HK-2 cells were transfected with a series of reporter constructs or a control reporter plasmid (pGL4.10), together with the HNF1 α -negative plasmid (pcDNA3.1, white bars) or HNF1 α expression plasmid (black bars). The position of the deleted region is indicated with 'Del(-51/-37)'. Relative luciferase activity is expressed as a fold increase in pGL4.10 and represents the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$.

1.3.6 HNF1 α 発現細胞における TSA 処理の SGLT2 mRNA 発現量への影響評価

ここまでの結果から、HK-2 細胞における SGLT2 遺伝子発現には SGLT2 5'-FR のヌクレオソーム占有状態と同領域における HNF1 α の結合が重要であると考えられる。そこで本項では、TSA 処理条件下において HNF1 α が SGLT2 mRNA 発現量に及ぼす影響を評価した。新生 RNA を特異的に分離できる nascent RNA capturing 法によって、total RNA と共に TSA 処理後に新たに転写された nascent RNA を回収し、SGLT2 mRNA 発現量を定量した (Fig. 9)。Total RNA と nascent RNA のいずれにおいても、TSA 処理条件下では pcDNA3.1 導入群と比較して、HNF1 α 発現群の SGLT2 mRNA 発現量に有意な増加が認められた。また、その増加率は total RNA と比べ nascent RNA で約 1.8 倍大きかった。対して、DMSO 処理条件下では HNF1 α による SGLT2 mRNA 発現量の有意な変動が認められなかった。以上の結果より、TSA 処理によって減少したヌクレオソーム占有率が HNF1 α による SGLT2 遺伝子の転写の活性化に重要な役割を有していることを示している。

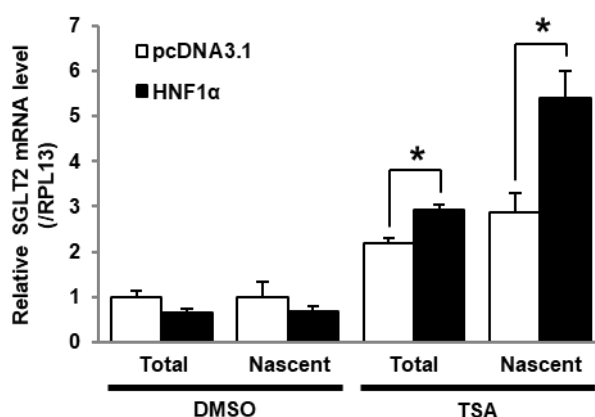


Fig. 9 Quantitative analysis of effects of the TSA treatment on SGLT2 mRNA levels in HNF1 α -expressing HK-2 cells

HK-2 cells were transfected with the HNF1 α -negative plasmid (pcDNA3.1, white bars) or HNF1 α expression plasmid (black bars), and treated with DMSO or TSA for 24 hours. Total and nascent SGLT2 mRNA levels were measured by quantitative PCR and normalized to RPL13 mRNA levels. Results are expressed relative to SGLT2 mRNA levels in empty pcDNA3.1-transfected cells treated with DMSO. Results represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$.

1.3.7 ヒト腎臓、肝臓および小腸におけるヌクレオソーム占有状態の解析

HNF1 α は肝臓や小腸などの様々な組織で発現している一方で、SGLT2 はこれらの組織における発現が認められていない。転写因子では説明のできない SGLT2 発現の臓器差のメカニズムを明らかにするため、各臓器におけるヌクレオソーム占有状態の解析を行った。ヒト肝臓および小腸検体を用いて、HNF1 α 結合領域を含む SGLT2 5'-FR のヌクレオソーム占有状態を解析し、腎組織のヌクレオソーム占有状態 (Fig. 4a) と比較した。転写開始点から約 300 bp 上流までの範囲において、ヒト肝臓および小腸検体では非常に高度なヌクレオソーム占有状態を示しており、ヒト腎組織と比べても顕著な相違が認められた (Fig. 10)。以上の結果より、組織特異的なヌクレオソーム占有状態が HNF1 α を介した SGLT2 遺伝子発現調節に重要な役割を有することが示唆される。

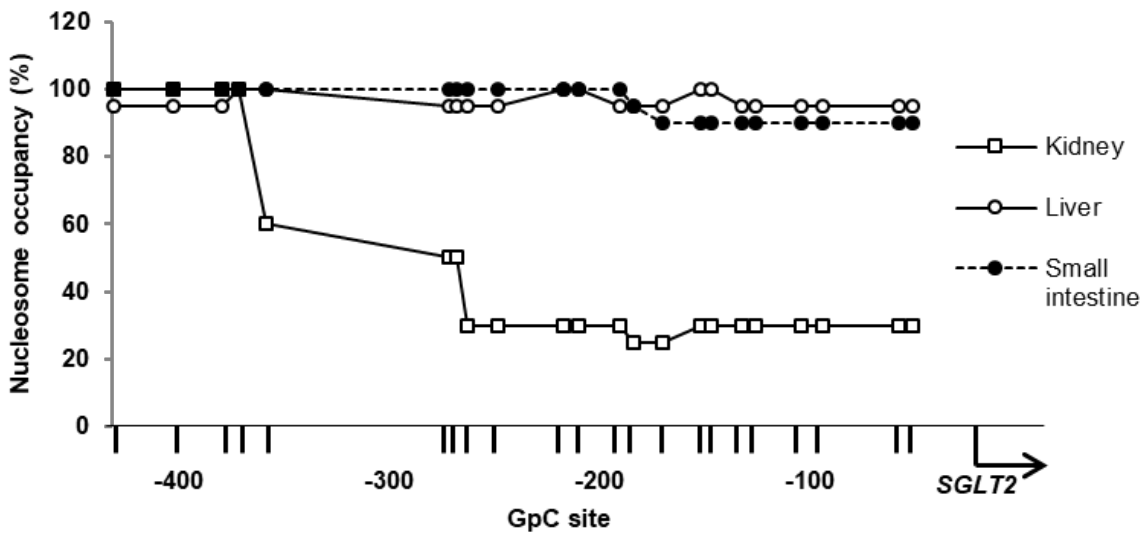


Fig. 10 Analysis of nucleosome occupancy in human kidney, liver, and small intestine tissues

NOMe-Seq data of SGLT2 5'-FR in human kidney (white squares), liver (white circles), and small intestine (black circles). Graph represents the proportion of nucleosome-occupied GpC sites in 5'-FR in the three tissues. The arrow indicates the SGLT2 TSS. Vertical lines indicate GpC sites.

1.4 考察

本研究を行うにあたり、*SGLT2* 遺伝子の特異的な発現部位である腎近位尿細管上皮を由来とする培養細胞およびヒト組織の選択を行った。過去の検討において、ブタ由来 LLC-PK1 細胞やマウス由来 KPT2 細胞、イヌ由来 MDCK 細胞といった様々な動物の腎近位尿細管上皮を由来とする細胞株を用いて、*SGLT2* の機能評価が行われてきた [37–39]。ヒトを由来とする腎近位尿細管上皮細胞株としては HK-2 細胞が広く知られており、HK-2 細胞内での *SGLT2* 遺伝子の発現調節に関する検討を行った報告があがっている [24, 40]。ヒト腎臓は、組織の外側に位置する皮質と内側に位置する髄質の 2 種類に分類される。これらの内、近位尿細管は皮質に分類されており、腎臓皮質中の *SGLT2* mRNA 発現量が他の組織と比べ、非常に高いことが報告されている [14]。併せて、腎臓髄質では *SGLT2* 遺伝子の発現がほとんど認められないことも明らかとなっている [14, 41]。従って、腎臓皮質の *SGLT2* 遺伝子に関する検討を行うことで、腎近位尿細管の *SGLT2* 遺伝子の発現調節機構を解析できると推測できる。以上より、本研究では、HK-2 細胞およびヒト腎臓皮質を使用することで、ヒト生体内における腎近位尿細管の *SGLT2* 遺伝子の詳細な発現調節機構の解明を試みた。

これまでに、腎近位尿細管上皮細胞における *SGLT2* 遺伝子の発現変動について検討を行った報告がある一方で、*SGLT2* 遺伝子の転写活性化メカニズムについて検討を行った報告はあがっていない。本研究では、HK-2 細胞内の *SGLT2* 遺伝子の転写活性が非常に弱い状態にあることを認めた (Fig. 3a)。また、ヒト腎臓組織と比較して、HK-2 細胞の *SGLT2* mRNA 発現量が極めて低いことを明らかとした (Fig. 3b)。これらの結果より、HK-2 細胞は、健常成人の腎近位尿細管上皮細胞を由来としているにもかかわらず [35]、*SGLT2* 遺伝子の発現が抑制状態にあることが示唆される。そこで我々は、HK-2 細胞とヒト腎臓組織における *SGLT2* 遺伝子発現の相違にエピジェネティクスが関与しているのではないかと考えた。遺伝子の転写調節に寄与するエピジェネティクスとしては、ヒストン修飾によるヌクレオソーム占有状態の変動が広く知られている。ヌクレオソーム解析の結果より、ヒト腎臓組織と比較して、HK-2 細胞の *SGLT2* 5'-FR がヌクレオソームによって高度に占有されていることが明らかとなった (Fig. 4)。ヌクレオソーム占有状態ではプロモーター領域やエンハンサー領域への転写因子の結合を阻害することで遺伝子の転写活性を抑制すると考えられている [28, 42]。また、ヒト生体内における転写抑制に寄与するエピジェネテ

ニック制御機構としてはヌクレオソーム占有状態に加えて DNA メチル化がよく知られており、転写因子の DNA への結合阻害による組織特異的な遺伝子発現調節に重要な機構であることが報告されている [43-46]。しかし、*SGLT2* 5'-FR における DNA メチル化状態については、HK-2 細胞とヒト腎組織との間に顕著な相違が認められなかった (data not shown)。そのため、DNA メチル化については、HK-2 細胞における *SGLT2* 遺伝子発現の抑制に重要な役割を担っていないものと考えられる。以上より、HK-2 細胞で *SGLT2* 遺伝子の弱い転写活性が認められた原因として、*SGLT2* 5'-FR の高度なヌクレオソーム占有状態の寄与が示唆される。

ヒストンアセチル化促進剤である TSA 処理により、HK-2 細胞内の *SGLT2* mRNA 発現量の増加、ヒストン H3 のアセチル化の促進および転写開始点から 300 bp 上流の範囲におけるヌクレオソーム占有率の低下が認められた (Figs. 5, 6)。ヒストン H3 はヒストンアセチル化に伴うヌクレオソーム動態や遺伝子発現の活性化を評価するためのターゲットとして多くの検討が行われており、TSA はこのヒストン H3 の N 末端側のアセチル化を強く促進させる機能を有している [47, 48]。これまでの検討により、転写活性のある遺伝子のプロモーター領域において高度なヒストン H3 のアセチル化および低いヌクレオソーム占有状態が認められている [49]。ヒストンアセチル化はヌクレオソーム占有状態を変動させる機能を有するため、転写因子の結合頻度を増加に寄与することが推測される [50, 51]。また、多くの転写活性を有する遺伝子において、プロモーター領域に低いヌクレオソーム占有状態が認められている [52]。以上より、TSA 処理によるヒストン H3 のアセチル化を介して減少した *SGLT2* 5'-FR のヌクレオソーム占有率が、転写因子の結合を促進することで *SGLT2* 遺伝子の発現量増加に寄与するというメカニズムが示唆される。

本研究では、TSA 処理によって HK-2 細胞内の HNF1 α 発現量の変動は認められなかったが、*SGLT2* 5'-FR への HNF1 α の結合頻度の増加が認められた (Fig. 7)。加えて、HK-2 細胞に HNF1 α を発現させたことで *SGLT2* 5'-FR の転写活性の増加が認められた (Fig. 8)。過去の報告より、TSA 処理によるプロモーター領域のヒストンアセチル化の促進に伴い、同領域への HNF1 α の結合頻度が増加することで発現量が増加する遺伝子が存在することが明らかとなっている [53]。以上より、TSA 処理による *SGLT2* mRNA 発現量の増加には *SGLT2* 5'-FR への HNF1 α の結合頻度の増加が寄与していると考えられる。さ

らに、*in silico* 解析によって予測された HNF1 α 結合領域 (-51/-37) を欠失させることにより、HNF1 α による転写活性の増加が認められなくなった (Fig. 8)。マウスおよびラット *Sglt2* では、転写開始点近傍の HNF1 α 結合領域周辺にプロモーター領域が存在すると考えられている [22, 23]。また、同領域への HNF1 α の結合頻度が減少することで *SGLT2* mRNA 発現が抑制されるという報告があがっている [24]。以上より、予測された HNF1 α 結合領域周辺がヒト *SGLT2* 遺伝子のプロモーター領域であることが示唆される。

HNF1 α を一過性に発現させた HK-2 細胞を用いた検討より、HNF1 α による *SGLT2* mRNA 発現量の増加は TSA 処理細胞でのみ認められ、その増加率は TSA 処理後のみの方が高いこと (Total = 3.41 倍、Nascent = 5.40 倍) を明らかとした (Fig. 9)。また、TSA 処理によって、予測された HNF1 α 結合領域のヌクレオソーム占有率が減少することが明らかとなっている (Fig. 6)。ヒストンアセチル化はヌクレオソーム占有率を減少させることで、プロモーター領域への転写因子の結合の促進に寄与することが知られている [54–56]。従って、*SGLT2* 5'-FR のヌクレオソーム占有状態が HNF1 α の結合の制御に非常に重要な機能を有しており、同機構を介して *SGLT2* 遺伝子の発現を制御していることを示している。

SGLT2 遺伝子が腎臓特異的に発現することは広く知られている一方で、その組織特異的な発現メカニズムについては未だに不明な点が多い [14, 57]。本研究にて、*SGLT2* 遺伝子の転写調節に重要な因子であることを特定した HNF1 α は腎臓のみならず、肝臓や小腸などの様々な組織で発現していることが知られている [58–60]。*SGLT2* 遺伝子の腎臓特異的な発現メカニズムを明らかにするため、CpG メチル化状態の解析を行った。その結果、ヒト腎臓、肝臓および小腸組織のいずれにおいても、*SGLT2* 5'-FR すべての CpG sites が高度にメチル化を受けており、組織間で顕著な差が認められなかった (data not shown)。従って、DNA メチル化は腎臓特異的な *SGLT2* 遺伝子発現調節に寄与していないと推測される。一方、ヒト腎臓、肝臓および小腸組織を用いたヌクレオソーム解析の結果より、ヒト腎臓と比較して、ヒト肝臓および小腸組織では *SGLT2* 5'-FR に極めて高度なヌクレオソーム占有状態を認めた (Fig. 10)。そのため、組織間で異なるヌクレオソーム占有状態が、*SGLT2* 5'-FR への組織特異的な HNF1 α 結合状態を制御することで、ヒト腎臓における組織特異的な *SGLT2* 遺伝子発現に寄与しているのではないかと考えられる。最近の研究では、組織特異的な遺伝子発現と転写開始点近傍の組織特異的なヌクレ

オソーム占有状態とが関連することを報告していることから [61]、腎臓特異的な *SGLT2* 遺伝子の発現に、転写開始点近傍のヌクレオソーム占有状態が寄与する可能性が示唆される。

近年、*SGLT2* の阻害が糖尿病の新たな治療戦略として注目されている [62, 63]。これまでの報告によると、*SGLT2* 発現量は健常成人と比べ、2型糖尿病患者で高いことが明らかとなっている [1, 2]。その一方で、2型糖尿病患者の腎臓で *SGLT2* mRNA 発現量が増加しなかったという報告もあがっている [3]。また、*HNF1α* 遺伝子変異が原因で罹患する若年発症成人型糖尿病 (MODY3) の患者では *SGLT2* 遺伝子発現量が減少するという報告があがっている [22, 64]。しかし、糖尿病患者における *SGLT2* 遺伝子の発現変動に関するメカニズムについてはほとんど明らかとなっていない現状にある。本研究では、*SGLT2* 遺伝子発現量が *SGLT2* 5'-FR への *HNF1α* の結合頻度と関連していることを明らかとしてきた。ラット腎臓を用いた研究では、*Sgl2* プロモーター領域の *HNF1α* 結合頻度の増加が、糖尿病による *Sgl2* 遺伝子発現量の増加に寄与することを報告している [23]。さらに、高ナトリウム食を与えたマウスでは *Sgl2* 5'-FR への *HNF1α* の結合頻度の減少による *SGLT2* 遺伝子発現量の減少が認められている [24]。従って、ヒト腎臓における *SGLT2* 5'-FR への *HNF1α* の結合頻度を解析することで、糖尿病患者にて *SGLT2* 遺伝子の発現がどのように制御されているかについての新たな知見が得られるのではないかと推察できる。

本研究により、ヒト腎臓における *SGLT2* 遺伝子の発現はプロモーター領域のヌクレオソーム占有状態および *HNF1α* 結合頻度によって調節を受けることを明らかとした。この発現調節機構は *SGLT2* 遺伝子の腎臓特異的な発現に重要な役割を有することが示唆された。本研究はヒト生体内において *SGLT2* 遺伝子がエピジェネティック制御を受けていることを初めて明らかにした報告である。今後は、ヒト生体内における *SGLT2* 遺伝子発現量の変動に、本研究が明らかとした発現調節機構が寄与することを明らかとするための更なる検討が必要であると考えられる。

第2章

高糖尿状態における *SGLT2* 遺伝子発現変動に対する ヒストンアセチル化の影響評価

2.1. 序論

2型糖尿病は遺伝的な影響や、過食、運動不足などの環境的な影響によって慢性的な高血糖状態となる疾病であり、生体組織のインスリン感受性の低下や膵β細胞の機能低下によるインスリン分泌の低下が生じることで発症する。高血糖状態では、糸球体ろ過を受けるグルコース量が増加するため、尿細管のグルコース濃度は健常成人と比べて高くなる。それに伴い、腎近位尿細管上皮細胞における最大グルコース再吸収能が増加することが明らかとなっている [65–67]。そのため、多くのグルコースが体外に排泄されることなく血中へと再流入するため、高血糖状態を維持する原因となっている。この原因として、2型糖尿病患者の腎近位尿細管上皮細胞における SGLT2 発現量の増加が考えられている。これまでの研究により、糖尿病モデルラットの腎臓において、SGLT2 mRNA およびタンパク質発現量の増加が認められている [23]。また、尿中から回収した腎近位尿細管上皮細胞を用いた研究では、健常成人と比較して、2型糖尿病患者における SGLT2 mRNA およびタンパク質発現量が増加することを報告している [1]。さらに、糖尿病性腎症患者から摘出した腎組織の SGLT2 発現量の上昇も認められている [2]。以上より、2型糖尿病患者における SGLT2 発現量の増加が、高血糖状態の維持に重要な寄与を示していると考えられる。

近年では、SGLT2 の機能阻害が糖尿病の新たな治療戦略に重要であると考えられており、新規経口血糖降下薬として SGLT2 阻害薬の開発が進められている。様々な動物実験や臨床試験により、SGLT2 阻害薬は血中グルコース濃度の低下や糖毒性の軽減、インスリン抵抗性の減少、体重減少に寄与するという結果が示されており、糖尿病治療に有効であることが明らかとなっている [68–70]。SGLT2 阻害薬による血糖降下作用は、正常な血糖値を示す健常成人と比べ、2型糖尿病患者でより強いことが知られている [71, 72]。このように、SGLT2 の機能阻害は重要な2型糖尿病の治療戦略であると言える。

SGLT2 の機能阻害に加え、SGLT2 発現量を低下させることによって、糖尿病で認められる諸症状の改善が報告されている。Sglt2 ノックアウトマウスを用いた検討では、グルコース排泄量の増加および糸球体ろ過量の減少が認められている [20, 21]。また、Sglt2 のノックアウトにより、膵β細胞の機能が改善することが明らかとなっている [73]。以上より、腎近位尿細管上皮細胞における SGLT2 発現量の減少が、新たな2型糖尿病の治療戦略となり得ると推測できる。しかし、2型糖尿病によって SGLT2 発現量

が変動するメカニズムを詳細に解明した報告は存在しない。従って、2型糖尿病患者の *SGLT2* 発現量変動に寄与する発現調節機構を明らかとすることで、新規の血糖降下薬の開発に向けた重要な知見が得られると考えられる。

ヒストンアセチル化はヌクレオソーム構造におけるヒストンタンパク質と DNA の結合を緩め、遺伝子発現や細胞増殖といった、多様な細胞の機能を制御するエピジェネティック機構として広く知られている [74, 75]。ヒストンアセチル化は、HATs が acetyl-coenzyme a (CoA) のアセチル基をヒストンタンパク質のリシン残基に転移することで促進され、HDACs によってアセチル基を取り除かれることで抑制される [76, 77]。そのため、HATs と HDACs の活性のバランスに応じて、ヌクレオソーム構造や遺伝子発現の状態が変動することが知られている [78]。2型糖尿病患者の腎臓では、様々な遺伝子のプロモーター領域におけるヒストンアセチル化の促進が認められており、遺伝子発現の増加に寄与することが報告されている [79–81]。第1章において、*SGLT2* 遺伝子の発現調節に *SGLT2* プロモーター領域におけるヒストンアセチル化が重要であることを解明してきた。以上の背景から、2型糖尿病患者における *SGLT2* 遺伝子発現量の変動に、*SGLT2* プロモーター領域のヒストンアセチル化が関与している可能性が推測される。

本研究では、ヒト腎近位尿細管上皮細胞を用いて、高グルコース状態でのヒストンアセチル化を介した *SGLT2* 遺伝子の発現調節機構の解析を行うこととした。始めに、HK-2 細胞を異なるグルコース濃度条件下で培養した時の、*SGLT2* 遺伝子発現量およびヒストンアセチル化状態を解析した。続いて、TSA 処理条件下における、高グルコース濃度での *SGLT2* 遺伝子の発現調節機構への影響評価を行った。さらに、高グルコース状態におけるヒストンアセチル化の促進に、解糖系を通じて変換される acetyl-CoA の増加が寄与していると仮定し、各グルコース濃度条件下における acetyl-CoA の定量を行った。

2.2. 方法

2.2.1 HK-2 細胞の培養

2.2.1.1 Preparation of glucose media

5 mM グルコース培地は、DMEM, no Glucose と Ham's F-12 Nutrient Mixture (10 mM glucose) を 1:1 の比率で混合することで調整した。17.5 mM グルコース培地は既製の DMEM/F-12 を使用した。35 mM グルコース培地は DMEM/F-12 に Glucose Solution を添加することで調整した。また、いずれの培地も 10% FBS となるように調整した。

2.2.1.2 Culturing

1.2.1.1 項と同様に HK-2 細胞の培養、回収および播種を行った。播種から 72 時間後には各濃度のグルコース培地に交換し、DMSO (control) および 1.0 μ M trichostatin A (TSA) 処理を行った後、24 時間培養した。

2.2.2 RNA 抽出および mRNA の定量

1.2.5 項と同様の手順で total RNA を回収し、逆転写反応によって作製した cDNA を用いて、real-time PCR にて relative SGLT2 mRNA expression level の定量を行った。

2.2.3 Chromatin immunoprecipitation assay

1.2.8 項と同様の手順で immunoprecipitated DNA および input DNA を回収し、quantitative PCR にて AcH3 enrichment および HNF1 α relative binding level を定量した。

2.2.4 HDAC activity assay

2.2.6.1 Preparation of nuclear extracts from HK-2 cells

HK-2 細胞を 6 well-plate に培養し、ice-cold PBS 1 mL で 2 回 wash を行った後、Lysis Buffer A [10 mM HEPES-NaOH (pH 7.9), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1% NP-40, 1 mM dithiothreitol, protease inhibitor cocktail (PIC)] を加え、氷上にて 30 分間静置した。セルスクレイパーを用いて細胞をプレートから剥がし、遠心 (4°C, 3,000 rpm, 5 min) して上清を除去した。ペレットを Lysis Buffer B [20 mM HEPES-NaOH (pH 7.9), 1.5 mM MgCl₂, 400 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1% NP-40, 10% glycerol, 1 mM dithiothreitol, PIC] にて溶解し、振盪 (4°C, 100 rpm, 1 h) を行った後、遠心 (4°C, 15,000 rpm, 5 min) して上清を回収した。1.2.9.3 項と同様に、Protein Assay Bicinchoninate Kit に従って、各核分画のタンパク質濃度を算出した。

2.2.6.2 Preparation of nuclear extracts from the human kidney

ヒト腎組織 10 mg を PBS 1 mL で 2 回 wash した後、Lysis Buffer A を加え、氷上にて 30 分間静置した。Potter-Elehjem Tissue Grinder を用いてホモジナイズを行い、75 µm nylon mesh を用いて組織片などの夾雑物を除去し、遠心 (4°C, 3,000 rpm, 5 min) して上清を除去した。Lysis Buffer B にて溶解し、以降は 2.2.6.1 項と同様の手順で核分画を回収した。

2.2.6.3 Measurement of HDAC activity

Epigenase™ HDAC Activity/Inhibition Direct Assay Kit (Fluorometric) に従い、各核分画 10 µg protein 中における HDAC 活性を定量した。HDAC 活性の阻害は付属の TSA を用いて、終濃度 1.0 µM となるように曝露した。阻害蛍光の定量には EnSight™ multimode plate reader を使用した。

2.2.5 Nucleosome-scanning assay

1.2.7 項と同様の手順で nucleosomal DNA および genomic DNA を回収し、quantitative PCR にて SGLT2 5'-FR のヌクレオソーム占有状態を定量的に解析した。

2.2.6 Acetyl-CoA assay

1.2.9.1 項と同様の手順にて HK-2 細胞の lysates を回収し、1.2.9.3 項に従って、lysate 中のタンパク質濃度を測定した。総タンパク質量 150 μg 分の lysate を使用し、滅菌 milli Q にて 50 μL にメスアップした後、Deproteinizing Sample Preparation Kit に従ってタンパク質の除去を行った。除タンパク後のサンプルを用いて、PicoProbe™ Acetyl CoA fluorometric Assay Kit に従い、各 lysate に存在する acetyl-CoA の定量を行った。蛍光の定量には EnSight™ multimode plate reader を使用した。

2.2.7 統計解析

有意差検定には統計解析ソフトウェア R を用いて行った。独立した 2 群間の平均値の比較には、F 検定による等分散性を確認した後、Student's *t*-test もしくは Welch's *t*-test にて統計解析を行った。多群間の平均値の比較には、Tukey-Kramer test を行った。有意水準は 5% とした。

2.3. 結果

2.3.1 各グルコース濃度条件下での SGLT2 mRNA 発現量および SGLT2 プロモーター領域のヒストンアセチル化状態の解析

既報において、グルコース濃度を増加させることでヒストンアセチル化の促進が認められ、それに伴って遺伝子発現が増加することが報告されている。そこで本研究では、低グルコース濃度 (5 mM)、および高グルコース濃度 (17.5, 35 mM) 条件下にて培養した HK-2 細胞における、SGLT2 mRNA 発現量および SGLT2 プロモーター領域のヒストンアセチル化状態の解析を行った。始めに、各培養群から作製した cDNA を用いて、SGLT2 mRNA 発現量を測定した。5 mM グルコース培養群と比較して、17.5, 35 mM グルコース培養群における SGLT2 mRNA 発現量の有意な増加は認められなかった (Fig. 11a)。続いて、anti-acetyl histone H3 antibody を用いた ChIP assay により、SGLT2 プロモーター領域のヒストンアセチル化状態を解析した。SGLT2 mRNA 発現量の結果と同様に、いずれのグルコース濃度条件下においても、SGLT2 プロモーター領域のヒストンアセチル化の促進は認められなかった (Fig. 11b)。

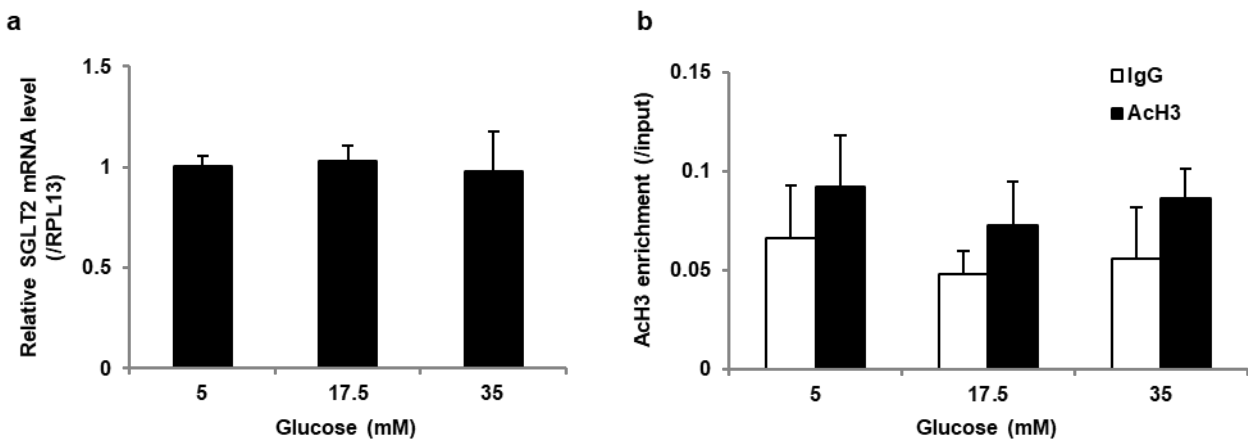


Fig. 11 Effects of various concentrations of glucose on levels of SGLT2 mRNA and histone acetylation of the SGLT2 promoter in HK-2 cells

HK-2 cells were cultured in 5, 17.5, and 35 mM of glucose media for 24 hours. (a) SGLT2 mRNA levels were measured by quantitative PCR and normalized to RPL13 mRNA levels. Results are expressed relative to SGLT2 mRNA levels in HK-2 cells with the 5 mM glucose. (b) ChIP analyses with quantitative PCR targeting the SGLT2 promoter using antibodies against normal IgG (white bars) and AcH3 (black bars). The AcH3 enrichment was expressed as the percentage of the immunoprecipitate over total input DNA. Results represent the mean \pm SD of three independent experiments.

2.3.2 ヒト腎組織および HK-2 細胞における HDAC 活性の比較

グルコース濃度を変動させたにもかかわらず、HK-2 細胞内の *SGLT2* プロモーター領域のヒストン H3 のアセチル化がほとんど認められなかったことから、HK-2 細胞ではヒストンアセチル化が抑制されている可能性が示唆される。そこで、細胞核抽出物を用いて HDAC activity assay を行い、ヒト腎組織と比較することで、HK-2 細胞の HDAC 活性を評価することとした (Fig. 12)。ヒト腎組織と比べて、HK-2 細胞ではいずれのグルコース濃度条件下においても、有意に高い HDAC 活性が認められた。また、グルコース濃度を変動させたことによる、HDAC 活性の変動は認められなかった。従って、HK-2 細胞における高い HDACs 活性が、グルコース濃度の変動によるヒストンアセチル化の促進が認められなかった原因ではないかと考えられる。

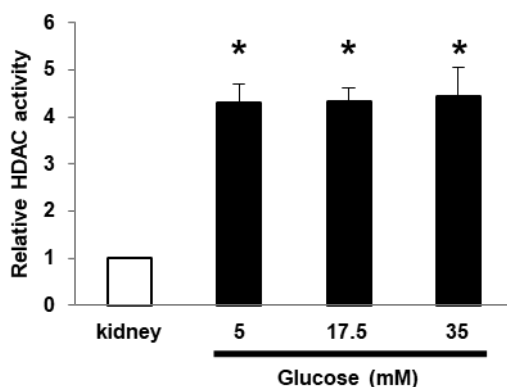


Fig. 12 HDAC activity in the human kidney and HK-2 cells

HDAC activity was measured by HDAC activity assay with nuclear extracts from the human kidney and HK-2 cells cultured in 5, 17.5, and 35 mM of glucose media. Results are expressed relative to enzymatic activity in the human kidney and represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$ versus kidney.

2.3.3 TSA 処理条件下での高グルコース濃度による SGLT2 mRNA 発現量およびヒストンアセチル化への影響評価

ヒト腎組織と比較して、HK-2 細胞の HDAC 活性が有意に高いことが明らかとなったため、HDACi の一種である TSA による処理を行い、HDAC 活性を阻害した条件での SGLT2 mRNA 発現量および SGLT2 5'-FR のヒストンアセチル化の解析を行った。始めに、HDAC activity assay にて、TSA 処理によって細胞核内の HDAC 活性が低下することを確認した (Fig. 13a)。各培養群から作製した cDNA を用いた quantitative PCR を行った結果、DMSO 処理群ではグルコース濃度の増加に伴う有意な SGLT2 mRNA 発現量の増加は認められなかった。一方で、TSA 処理条件下では、5 mM グルコース培養群と比較して 17.5, 35 mM グルコース培養群で有意な SGLT2 mRNA 発現量の増加を認めた (Fig. 13b)。Anti-acetyl histone H3 antibody を用いた ChIP assay でも同様に、DMSO 処理条件下ではグルコース濃度の増加に伴う SGLT2 プロモーター領域のヒストンアセチル化の有意な促進が認められなかった一方で、TSA 処理条件下では 5 mM グルコース培養群と比較して 17.5, 35 mM グルコース培養群で有意なヒストンアセチル化の促進を認めた (Fig. 13c,d)。以上より、高グルコース濃度条件下における SGLT2 遺伝子の発現上昇に、SGLT2 プロモーター領域のヒストンアセチル化の促進が寄与する可能性が示唆される。

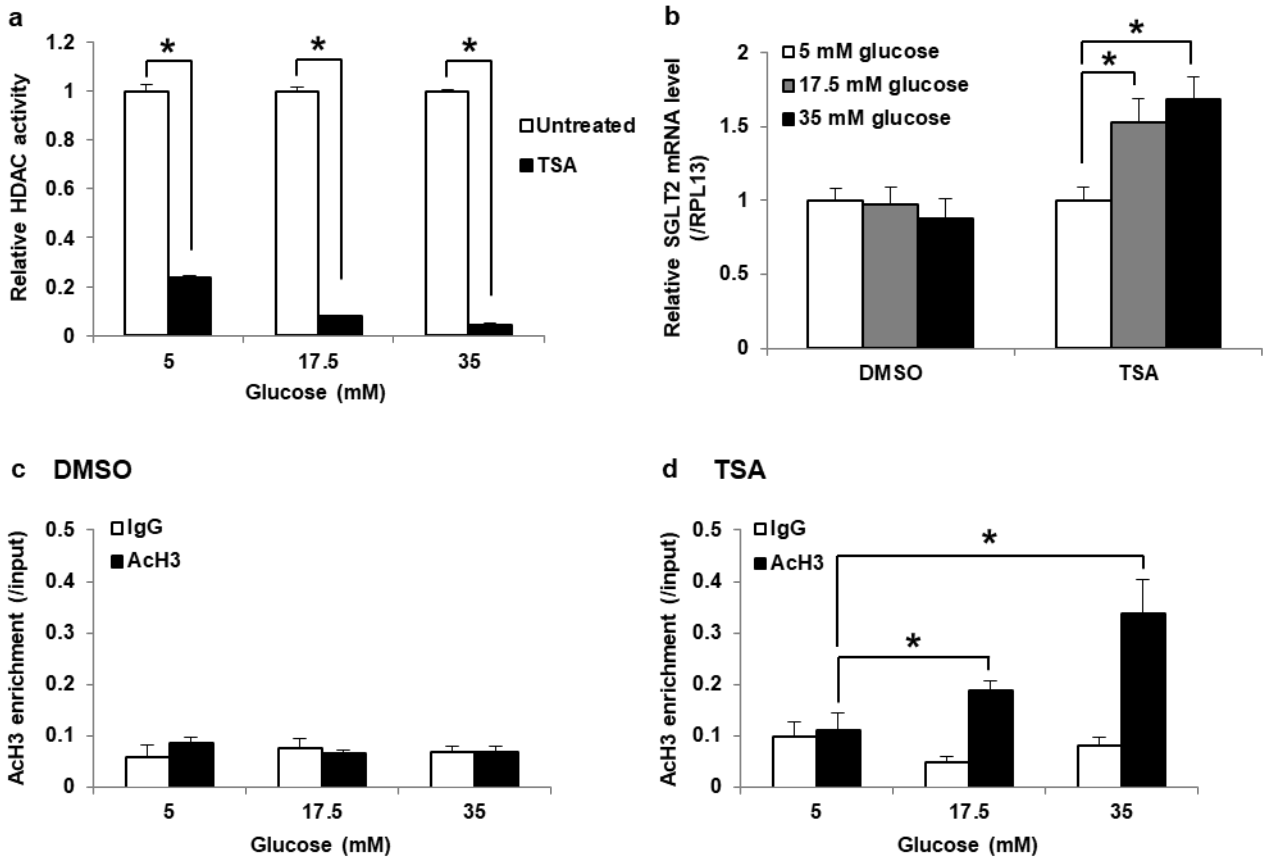


Fig. 13 Effects of various concentrations of glucose on levels of SGLT2 mRNA and histone acetylation of the SGLT2 promoter in TSA-treated HK-2 cells

HK-2 cells were cultured in 5, 17.5, and 35 mM of glucose media for 24 hours. (a) HDAC activity was measured by HDAC activity assay with untreated (white bars) or TSA-treated nuclear extracts (black bars) from the HK-2 cells. Results are expressed relative to enzymatic activities in untreated group. (b) HK-2 cells were treated with DMSO (control) or TSA for 24 hours. SGLT2 mRNA levels were measured by quantitative PCR and normalized to RPL13 mRNA levels. Results are expressed relative to SGLT2 mRNA levels in DMSO group. (c,d) ChIP analyses with quantitative PCR targeting the SGLT2 promoter in (c) DMSO- or (d) TSA-treated cells using antibodies against normal IgG (white bars) and Ach3 (black bars). The Ach3 enrichment was expressed as the percentage of the immunoprecipitate over total input DNA. Results represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$.

2.3.4 TSA 処理条件下での高グルコース濃度による *SGLT2* プロモーター領域のヌクレオソーム占有率および HNF1 α 結合頻度への影響評価

第 1 章の検討では、TSA 処理によるヒストンアセチル化を介した *SGLT2* mRNA 発現量の増加に *SGLT2* プロモーター領域のヌクレオソーム占有率の減少および HNF1 α 結合頻度の増加が寄与していることを明らかとした。そのため、前項で認めた TSA 処理条件下における高グルコース濃度による *SGLT2* mRNA 発現量の増加には、*SGLT2* プロモーター領域のヌクレオソーム占有状態および HNF1 α 結合頻度が関与しているのではないかと推測できる。本項目ではまず、NuSA にて各グルコース濃度条件下における *SGLT2* プロモーター領域のヌクレオソーム占有率の解析を行った。各グルコース濃度条件下における DMSO 処理群と比較したところ、5 mM グルコース条件下では TSA 処理によるヌクレオソーム占有率の減少が認められなかった (Fig. 14a)。一方で、17.5, 35 mM グルコース濃度条件下では TSA 処理によって *SGLT2* プロモーター領域におけるヌクレオソーム占有率の減少が認められた (Fig. 14b, c)。続いて、anti-HNF1 α antibody を用いた ChIP assay を行い、*SGLT2* プロモーター領域の HNF1 α 結合頻度を解析した。ヒストンアセチル化の結果と同様に、DMSO 処理条件下ではグルコース濃度の増加に伴う同領域への有意な HNF1 α 結合頻度の増加が認められなかった一方で、TSA 処理条件下では 5 mM グルコース培養群と比較して 17.5, 35 mM グルコース培養群で同領域への有意な HNF1 α 結合頻度の増加を認めた (Fig. 15)。これらの結果より、高グルコース濃度条件下におけるヒストンアセチル化を介した *SGLT2* 遺伝子の発現上昇に、*SGLT2* プロモーター領域のヌクレオソーム占有状態の低下に伴う HNF1 α 結合の増加が寄与していると考えられる。

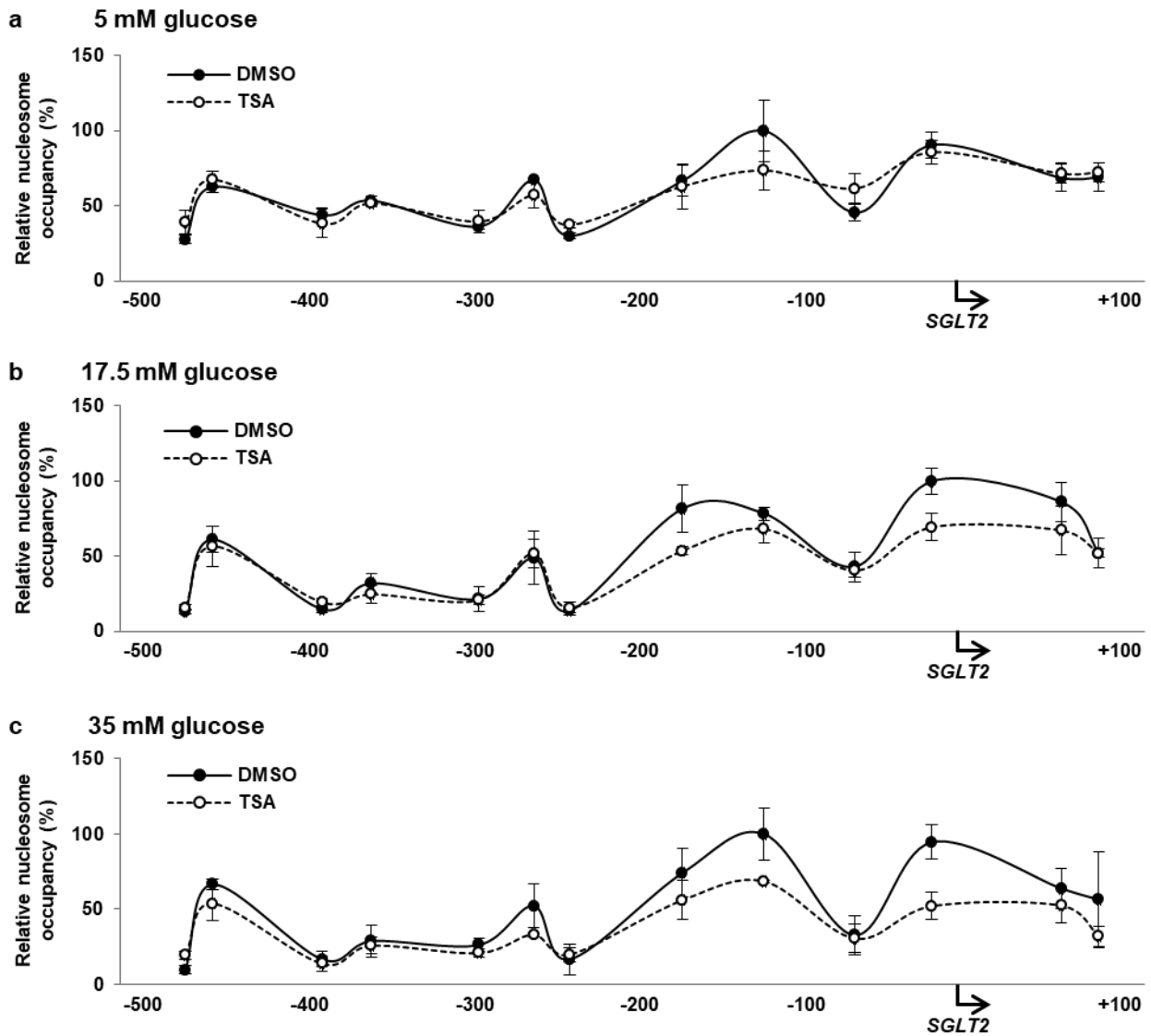


Fig. 14 Effects of various concentrations of glucose on nucleosome occupancy in the *SGLT2* promoter in TSA-treated HK-2 cells

NuSA data of the *SGLT2* promoter in DMSO- (black circles) or TSA-treated cells (white circles) cultured in (a) 5, (b) 17.5, and (c) 35 mM of glucose media. Relative nucleosome occupancy is expressed relative to the level of nucleosome occupancy in each sample without the MNase treatment and indicated by the midpoints of each amplicon. Results represent the mean \pm SD of three independent experiments.

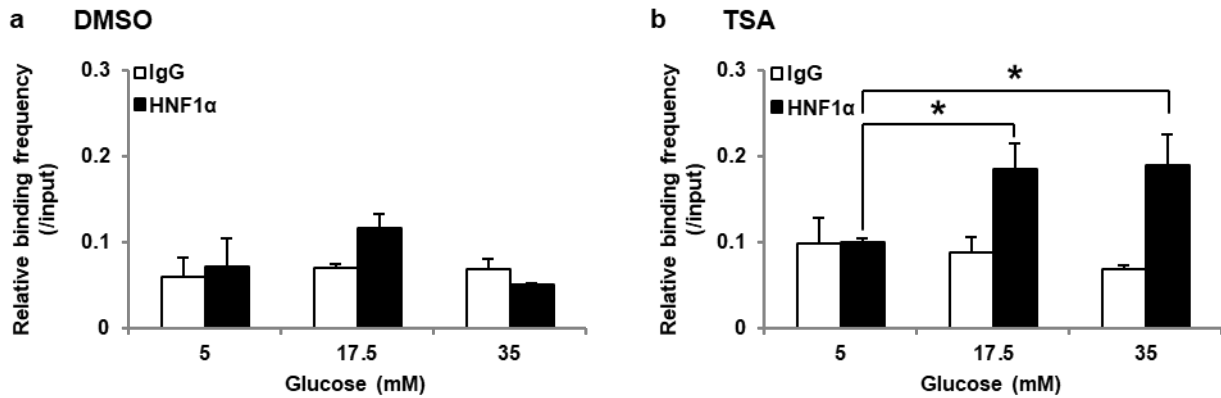


Fig. 15 Effects of various concentrations of glucose on HNF1 α binding frequency in the *SGLT2* promoter in TSA-treated HK-2 cells

ChIP analyses with quantitative PCR targeting the HNF1 α -binding site in *SGLT2* 5'-FR in (a) DMSO- or (b) TSA-treated cells cultured in 5, 17.5, and 35 mM of glucose media using antibodies against normal IgG (white bars) and HNF1 α (black bars). The relative binding frequency of HNF1 α was measured by quantitative PCR and normalized to that of the input. Results represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$.

2.3.5 各グルコース濃度条件下での acetyl-CoA の定量

細胞内のグルコース濃度が増加することでヒストンアセチル化のアセチル基供与体である acetyl-CoA が増加することが知られている。そこで、Acetyl-CoA assay によって各グルコース濃度条件下における HK-2 細胞の acetyl-CoA の定量を行った (Fig. 16)。5 mM グルコース条件下と比較して、17.5, 35 mM グルコース濃度条件下では有意な acetyl-CoA レベルの増加が認められた。これら結果より、グルコース濃度に応じた *SGLT2* プロモーター領域のヒストンアセチル化状態に、HK-2 細胞内の acetyl-CoA レベルが影響している可能性が示唆される。

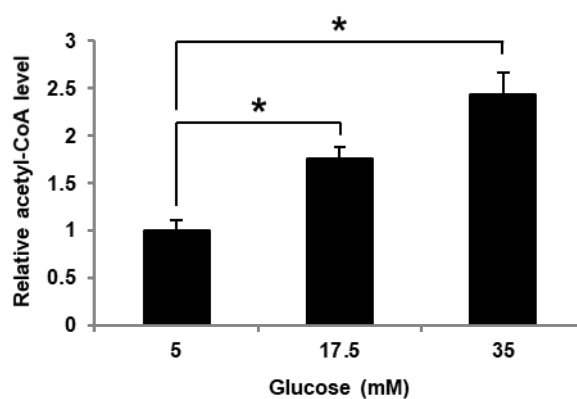


Fig. 16 Effects of various concentrations of glucose on acetyl-CoA levels in HK-2 cells

HDAC activity was measured by acetyl-CoA assay with deproteinized lysates from HK-2 cells. Results are expressed relative to acetyl-CoA levels in HK-2 cells with the 5 mM glucose and represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$.

2.4. 考察

始めに、本研究にあたり、高グルコース濃度における HK-2 細胞の培養のために、使用するグルコース培地の濃度を検討した。HK-2 細胞を使用した多くの論文では、17.5 mM のグルコース培地を使用しており、同濃度は高グルコース状態での培養とされている [1]。従来の腎近位尿細管上皮細胞を用いた *in vitro* 実験系では、低濃度として約 5 mM グルコース培地を、高濃度として約 30 mM グルコース培地を用いて検討が行われてきた [82]。そこで本研究では、5, 17.5, 35 mM グルコース培地を用いて HK-2 細胞を培養し、高グルコース状態が *SGLT2* プロモーター領域におけるヒストンアセチル化に与える影響、それに伴う *SGLT2* 遺伝子発現の増加への影響の評価を行った。

2 型糖尿病によって、腎近位尿細管上皮細胞の *SGLT2* mRNA 発現量が増加することは様々な研究で報告されてきた [1, 2, 23]。そのため、尿細管中のグルコース濃度が上昇することで、腎近位尿細管上皮細胞の *SGLT2* mRNA 発現量が増加する可能性が推測できる。しかし、低グルコース濃度 (5 mM) と比較して、高グルコース濃度 (17.5, 35 mM) における *SGLT2* mRNA 発現量の上昇は認められなかった (Fig. 11a)。第 1 章の結果より、ヒト腎組織と比べて、HK-2 細胞の *SGLT2* mRNA 発現量が顕著に低く、この原因として HK-2 細胞における *SGLT2* プロモーター領域の低いヒストンアセチル化状態の寄与が示唆されている (Fig. 3b and 5d)。各グルコース濃度条件下でのヒストンアセチル化の解析の結果より、いずれのグルコース濃度条件下においても、同領域の低いヒストンアセチル化状態が認められた (Fig. 11b)。従って、ヒト腎組織と比べて、HK-2 細胞では *SGLT2* プロモーター領域のヒストンアセチル化を抑制する機構の介在が示唆される。ヒストンアセチル化抑制機構を明らかにするため、ヒト腎組織および HK-2 細胞における細胞核内の HDAC 活性を評価したところ、グルコース濃度に関わらずヒト腎組織と比べて HK-2 細胞で非常に強い HDAC 活性が認められた (Fig. 12)。以上の結果より、HK-2 細胞における高い HDAC 活性が、ヒト腎組織と比べて低いヒストンアセチル化を引き起こすことが示唆される。また、この高 HDAC 活性が、グルコース濃度変動による *SGLT2* プロモーター領域のヒストンアセチル化を抑制したため、*SGLT2* 発現の変動が示されていないと考えられる。

ここまでの結果から、ヒト腎組織で示唆されている高グルコース濃度による *SGLT2* mRNA 発現上昇が、HK-2 細胞では認められない要因として、ヒト腎組織と比べて非常に強い HDAC 活性が示唆された。

そこで、次に TSA 処理による HDAC 活性阻害条件下にて、グルコース濃度変動が *SGLT2* 遺伝子発現に及ぼす影響を評価することとした。HK-2 細胞の核内 HDAC 活性を十分に阻害する TSA 処理条件下にて、各グルコース濃度条件下での *SGLT2* mRNA 発現量およびヒストンアセチル化を解析したところ、TSA 処理条件下では高濃度グルコース (17.5, 35 mM) による有意な *SGLT2* mRNA 発現量の増加および *SGLT2* プロモーター領域のヒストンアセチル化の促進が認められた一方で、DMSO 処理条件下では有意な変動が認められなかった (Fig. 13)。また、第 1 章では、TSA 処理によるヒストンアセチル化の促進は、同領域におけるヌクレオソーム占有率の低下および HNF1 α 結合頻度の増加に寄与することを明らかにしている (Fig. 5e,f and 6b)。各グルコース濃度条件下でのヌクレオソーム占有状態および HNF1 α 結合状態を解析した結果、TSA 処理条件下において高濃度グルコースによる *SGLT2* プロモーター領域のヌクレオソーム占有率の低下および HNF1 α の結合頻度の増加を認めた (Fig. 14 and 15)。以上の結果より、2 型糖尿病による腎近位尿管上皮細胞の *SGLT2* mRNA 発現量増加は、*SGLT2* プロモーター領域のヒストンアセチル化の促進、同領域のヌクレオソーム占有状態の低下に伴う HNF1 α 結合頻度の増加によって引き起こされる可能性が示唆された。

これまでの結果により、グルコース濃度変動がヒストンアセチル化に影響を及ぼすことが明らかとなった一方で、どのようなメカニズムがヒストンアセチル化を制御しているかについては依然として不明である。ヒストンタンパク質は HATs によってアセチル化を受けるが、その際に acetyl-CoA のアセチル基を利用することが知られている [76, 77]。既報により、細胞内の acetyl-CoA レベルが増加することによって、HATs によるヒストンアセチル化が促進することが報告されている [83]。Acetyl-CoA は解糖系によってグルコースから合成されるため、糖尿病患者では解糖系の機能亢進による acetyl-CoA レベルの増加が認められている [84, 85]。そこで、各グルコース濃度条件下における HK-2 細胞内の acetyl-CoA の定量を行った。その結果、グルコース濃度の増加に伴い、HK-2 細胞内の acetyl-CoA レベルの有意な増加が認められた (Fig. 16)。以上の結果より、グルコース濃度の増加に伴うヒストンアセチル化の促進に、HK-2 細胞内の acetyl-CoA レベルの上昇が寄与する可能性が示唆された。一方で、本研究では、グルコース濃度の増加に伴う、*SGLT2* プロモーター領域のヒストンアセチル化の促進と細胞内 acetyl-CoA レベルの増加が関連していることを証明するための検討を行っていない。ヒストンアセチル化に利用さ

れる細胞核の acetyl-CoA は、ATP-citrate lyase の働きによってクエン酸から合成される [77]。既報にて、ATP-citrate lyase 活性依存的にグルコースがヒストンアセチル化の活性化に寄与することが報告されている [86]。そのため、ATP-citrate lyase の機能を阻害した時のヒストンアセチル化状態および *SGLT2* 遺伝子発現量を解析することで、グルコース濃度の増加に伴う *SGLT2* プロモーター領域のヒストンアセチル化の促進と acetyl-CoA レベルの増加との関係性を明らかとすることが出来るのではないかと推測できる。

HK-2 細胞と比べて、ヒト腎組織では HDACs 活性が低い状態にあることを明らかとした (Fig. 12)。2 型糖尿病患者では、腎近位尿細管上皮細胞における *SGLT2* 発現量が増加することにより、より多くのグルコースが細胞内に取り込まれるとの報告が挙げられている [1]。従って、ヒト生体内において腎近位尿細管上皮細胞が高グルコース濃度条件下に曝された場合、acetyl-CoA の増加に伴う、*SGLT2* プロモーター領域のヒストンアセチル化の促進および *SGLT2* mRNA 発現量の増加が推測される。現在までに、ヒト腎組織を対象とした *SGLT2* プロモーター領域のヒストンアセチル化状態を解析した報告はあがっていない。今後の研究により、ヒト生体内における腎近位尿細管上皮細胞のヒストンアセチル化の解析を行うことで、2 型糖尿病患者における *SGLT2* 遺伝子発現の変動機構に関する新たな知見が得られるのではないかと考えられる。

本研究は、グルコースがエピジェネティック制御機構を介して、*SGLT2* 遺伝子の発現調節に寄与することを明らかとした初の報告である。今後は、2 型糖尿病患者における *SGLT2* 遺伝子発現の変動へのヒストンアセチル化を介した発現調節機構の寄与を明らかとするための更なる検討が必要であると考えられる。

総括

本研究では、エピジェネティック制御機構を介したヒト腎臓 *SGLT2* 遺伝子の発現調節機構に関する研究を行った。

第1章では、ヒト腎臓 *SGLT2* 遺伝子の発現調節におけるヌクレオソーム占有状態の寄与について解析を行った。第2章では、2型糖尿病によって増加する腎近位尿細管上皮細胞 *SGLT2* 遺伝子の発現調節におけるヒストンアセチル化制御機構の検討を行った。本研究の結果、*SGLT2* プロモーター領域のヌクレオソーム占有状態が、ヒト腎臓 *SGLT2* 遺伝子の発現調節に重要であることが明らかとなった。また、同領域におけるヒストンアセチル化の促進にグルコースが関与していることが明らかとなった。これらの結果は、2型糖尿病患者で認められる *SGLT2* 遺伝子の発現量増加にヒストンアセチル化が寄与していることを示唆する結果となった。

近年の報告により、2型糖尿病患者におけるヒストンアセチル化状態の変動は、糖尿病性合併症の諸症状に様々な影響を及ぼしていることが明らかとなっている。2型糖尿病の腎臓では、ヒストンアセチル化の亢進によって複数の転写因子の発現量が増加し、線維化に重要な因子であるフィブロネクチンが増加することが報告されている [87, 88]。一方で、2型糖尿病による HDACs の活性化によって、TGF- β 1 (transforming growth factor-beta 1) 経路の活性化を介した糖尿病性腎症の悪化が認められている [89, 90]。そのため、2型糖尿病におけるヒストンアセチル化に関する研究は、2型糖尿病がどのようなメカニズムで生体に悪影響を与えているのかについての知見を得る上で非常に重要であると言える。本研究は、2型糖尿病における高血糖状態の維持に影響する *SGLT2* 遺伝子の発現増加にヒストンアセチル化が寄与する可能性を初めて示した報告であり、2型糖尿病における高血糖の病態メカニズムの一端を解明した。最後に、本研究によって得られた知見が、2型糖尿病の治療戦略の発展の一助となることを期待する。

引用文献

1. Rahmoune H, Thompson PW, Ward JM, et al (2005) Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 54:3427–3434. doi: 10.2337/diabetes.54.12.3427
2. Wang XX, Levi J, Luo Y, et al (2017) SGLT2 protein expression is increased in human diabetic nephropathy: SGLT2 protein inhibition decreases renal lipid accumulation, inflammation, and the development of nephropathy in diabetic mice. *J Biol Chem* 292:5335–5348. doi: 10.1074/jbc.M117.779520
3. Solini A, Rossi C, Mazzanti CM, et al (2017) SGLT2 and SGLT1 renal expression in patients with type 2 diabetes. *Diabetes, Obes Metab* 1–6. doi: 10.1111/dom.12970
4. Tan Y, Ichikawa T, Li J, et al (2011) Diabetic downregulation of Nrf2 activity via ERK contributes to oxidative stress-induced insulin resistance in cardiac cells in vitro and in vivo. *Diabetes* 60:625–633. doi: 10.2337/db10-1164
5. Li H, Zhang L, Wang F, et al (2011) Attenuation of glomerular injury in diabetic mice with tert-butylhydroquinone through nuclear factor erythroid 2-related factor 2-dependent antioxidant gene activation. *Am J Nephrol* 33:289–297. doi: 10.1159/000324694
6. Cheng AS, Cheng YH, Chiou CH, Chang TL (2012) Resveratrol upregulates Nrf2 expression to attenuate methylglyoxal-induced insulin resistance in hep G2 cells. *J Agric Food Chem* 60:9180–9187. doi: 10.1021/jf302831d
7. Dieter BP (2015) Dysregulation of Nrf2 Signaling in Diabetes: An Opportunity for a Multitarget Approach. *J Diabetes Metab*. doi: 10.4172/2155-6156.1000475
8. Shimada M, Mochizuki K, Goda T (2009) Feeding rats dietary resistant starch shifts the peak of SGLT1 gene expression and histone H3 acetylation on the Gene from the Upper Jejunum toward the Ileum. *J Agric Food Chem* 57:8049–8055. doi: 10.1021/jf900594z
9. Honma K, Mochizuki K, Goda T (2009) Inductions of histone H3 acetylation at lysine 9 on SGLT1 gene and its expression by feeding mice a high carbohydrate/fat ratio diet. *Nutrition* 25:40–44. doi: 10.1016/j.nut.2008.07.006

10. Inoue S, Mochizuki K, Goda T (2011) Jejunal induction of SI and SGLT1 genes in rats by high-starch/low-fat diet is associated with histone acetylation and binding of GCN5 on the genes. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 57:162–169. doi: 10.3177/jnsv.57.162
11. Zheng S, Rollet M, Pan YX (2012) Protein restriction during gestation alters histone modifications at the glucose transporter 4 (GLUT4) promoter region and induces GLUT4 expression in skeletal muscle of female rat offspring. *J Nutr Biochem* 23:1064–1071. doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.05.013
12. Wright EM (2001) Renal Na⁺-glucose cotransporters. *Am J Physiol Ren Physiol* 280:F10–F18.
13. López GP, Albarrán OG, Megías MC (2010) Sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitors: from renal glycosuria to the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nefrologia* 30:618–625. doi: 10.3265/Nefrologia.pre2010.Sep.10494
14. Chen J, Williams S, Ho S, et al (2010) Quantitative PCR tissue expression profiling of the human SGLT2 gene and related family members. *Diabetes Ther* 1:57–92. doi: 10.1007/s13300-010-0006-4
15. Gerich JE (2010) Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: Therapeutic implications. *Diabet Med* 27:136–142. doi: 10.1111/j.1464-5491.2009.02894.x
16. Van Den Heuvel LP, Assink K, Willemsen M, Monnens L (2002) Autosomal recessive renal glucosuria attributable to a mutation in the sodium glucose cotransporter (SGLT2). *Hum Genet* 111:544–547. doi: 10.1007/s00439-002-0820-5
17. Magen D, Sprecher ELI, Zelikovic I, Skorecki K (2005) A novel missense mutation in SLC5A2 encoding SGLT2 underlies autosomal-recessive renal glucosuria and aminoaciduria. *Kidney Int* 67:34–41. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00053.x
18. Santer R, Calado J (2010) Familial renal glucosuria and SGLT2: From a Mendelian trait to a therapeutic target. *Clin J Am Soc Nephrol* 5:133–141. doi: 10.2215/CJN.04010609
19. Yu L, Lv JC, Zhou XJ, et al (2011) Abnormal expression and dysfunction of novel SGLT2 mutations identified in familial renal glucosuria patients. *Hum Genet* 129:335–344. doi: 10.1007/s00439-010-0927-z
20. Vallon V, Platt KA, Cunard R, et al (2011) SGLT2 mediates glucose reabsorption in the early proximal tubule. *J*

Am Soc Nephrol 22:104–12. doi: 10.1681/ASN.2010030246

21. Vallon V, Rose M, Gerasimova M, et al (2013) Knockout of Na-glucose transporter SGLT2 attenuates hyperglycemia and glomerular hyperfiltration but not kidney growth or injury in diabetes mellitus. *Am J Physiol Ren Physiol* 304:F156–F167. doi: 10.1152/ajprenal.00409.2012
22. Pontoglio M, Prié D, Cheret C, et al (2000) HNF1alpha controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO Rep* 1:359–65. doi: 10.1093/embo-reports/kvd071
23. Freitas HS, Anhê GF, Melo KFS, et al (2008) Na⁺-glucose transporter-2 messenger ribonucleic acid expression in kidney of diabetic rats correlates with glycemic levels: Involvement of hepatocyte nuclear factor-1 α expression and activity. *Endocrinology* 149:717–724. doi: 10.1210/en.2007-1088
24. Zhao Y, Gao P, Sun F, et al (2016) Sodium Intake Regulates Glucose Homeostasis through the PPAR δ /Adiponectin-Mediated SGLT2 Pathway. *Cell Metab* 23:699–711. doi: 10.1016/j.cmet.2016.02.019
25. Bonner C, Kerr-Conte J, Gmyr V, et al (2015) Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion. *Nat Med* 21:512–7. doi: 10.1038/nm.3828
26. Kothinti RK, Blodgett AB, Petering DH, Tabatabai NM (2010) Cadmium down-regulation of kidney Sp1 binding to mouse SGLT1 and SGLT2 gene promoters: Possible reaction of cadmium with the zinc finger domain of Sp1. *Toxicol Appl Pharmacol* 244:254–262. doi: 10.1016/j.taap.2009.12.038
27. Workman JL (2006) Nucleosome displacement in transcription. *Genes Dev* 20:2009–2017. doi: 10.1101/gad.1435706
28. Lorch Y, LaPointe JW, Kornberg RD (1987) Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell* 49:203–210. doi: 10.1016/0092-8674(87)90561-7
29. Hoffman BG, Robertson G, Zavaglia B, et al (2010) Locus co-occupancy, nucleosome positioning, and H3K4me1 regulate the functionality of FOXA2-, HNF4A-, and PDX1-bound loci in islets and liver. *Genome Res* 20:1037–1051. doi: 10.1101/gr.104356.109
30. Hu G, Schones DE, Cui K, et al (2011) Regulation of nucleosome landscape and transcription factor targeting at tissue-specific enhancers by BRG1. *Genome Res* 21:1650–1658. doi: 10.1101/gr.121145.111

31. Tsui K, Dubuis S, Gebbia M, et al (2011) Evolution of Nucleosome Occupancy: Conservation of Global Properties and Divergence of Gene-Specific Patterns. *Mol Cell Biol* 31:4348–4355. doi: 10.1128/MCB.05276-11
32. Yang Z, Yoshioka H, McCarrey JR (2013) Sequence-specific promoter elements regulate temporal-specific changes in chromatin required for testis-specific activation of the *Pgk2* gene. *Reproduction* 146:501–516. doi: 10.1530/REP-13-0311
33. Zhang T, Zhang W, Jiang J (2015) Genome-Wide Nucleosome Occupancy and Positioning and Their Impact on Gene Expression and Evolution in Plants. *Plant Physiol* 168:1406–1416. doi: 10.1104/pp.15.00125
34. Pfaffl M (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res* 29:16–21. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
35. Ryan MJ, Johnson G, Kirk J, et al (1994) HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int* 45:48–57. doi: 10.1038/ki.1994.6
36. Wilmer MJ, Saleem MA, Masereeuw R, et al (2010) Novel conditionally immortalized human proximal tubule cell line expressing functional influx and efflux transporters. *Cell Tissue Res* 339:449–457. doi: 10.1007/s00441-009-0882-y
37. Zapata-Morales JR, Galicia-Cruz OG, Franco M, Morales FM (2014) Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) protein diminishes sodium glucose transport 1 (SGLT1) and SGLT2 protein expression In renal epithelial tubular cells (LLC-PK1) under hypoxia. *J Biol Chem* 289:346–357. doi: 10.1074/jbc.M113.526814
38. Jiang M, Wang Q, Karasawa T, et al (2014) Sodium-glucose transporter-2 (SGLT2; SLC5A2) enhances cellular uptake of aminoglycosides. *PLoS One* 9:e108941. doi: 10.1371/journal.pone.0108941
39. Da Costa-Pessoa JM, Damasceno RS, Machado UF, et al (2014) High glucose concentration stimulates NHE-1 activity in distal nephron cells: The role of the Mek/Erk1/2/p90 and p38MAPK signaling pathways. *Cell Physiol Biochem* 33:333–343. doi: 10.1159/000356673
40. Panchapakesan U, Pegg K, Gross S, et al (2013) Effects of SGLT2 Inhibition in Human Kidney Proximal Tubular Cells-Renoprotection in Diabetic Nephropathy? *PLoS One* 8:e54442. doi: 10.1371/journal.pone.0054442
41. You G, Lee WS, Barros EJJ, et al (1995) Molecular characteristics of Na⁺-coupled glucose transporters in adult

- and embryonic rat kidney. *J Biol Chem* 270:29365–29371. doi: 10.1074/jbc.270.49.29365
42. Kornberg RD, Lorch Y (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98:285–294. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81958-3
 43. Jones PA, Baylin SB (2007) The Epigenomics of Cancer. *Cell* 128:683–692. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.029
 44. Song F, Smith JF, Kimura MT, et al (2005) Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3336–41. doi: 10.1073/pnas.0408436102
 45. Moore LD, Le T, Fan G (2013) DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* 38:23–38. doi: 10.1038/npp.2012.112
 46. Medvedeva YA, Khamis AM, Kulakovskiy IV, et al (2014) Effects of cytosine methylation on transcription factor binding sites. *BMC Genomics* 15:119. doi: 10.1186/1471-2164-15-119
 47. Choi JK, Howe LJ (2009) Histone acetylation: truth of consequences? *Biochem Cell Biol* 87:139–150. doi: 10.1139/O08-112
 48. Hansen JC, Nyborg JK, Luger K, Stargell LA (2010) Histone chaperones, histone acetylation, and the fluidity of the chromogenome. *J Cell Physiol* 224:289–299. doi: 10.1002/jcp.22150
 49. Strenkert D, Schmollinger S, Sommer F, et al (2011) Transcription factor-dependent chromatin remodeling at heat shock and copper-responsive promoters in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 23:2285–301. doi: 10.1105/tpc.111.085266
 50. Norton VG, Imai BS, Yau P, Bradbury EM (1989) Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. *Cell* 57:449–457. doi: 10.1016/0092-8674(89)90920-3
 51. Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, Wolffe AP (1993) A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 72:73–84. doi: 10.1016/0092-8674(93)90051-Q
 52. Bell O, Tiwari VK, Thomä NH, Schübeler D (2011) Determinants and dynamics of genome accessibility. *Nat Rev Genet* 12:554–64. doi: 10.1038/nrg3017
 53. Yang H, Nie Y, Li Y, Wan Y-JY (2010) Histone modification-mediated CYP2E1 gene expression and apoptosis

- of HepG2 cells. *Exp Biol Med* (Maywood) 235:32–39. doi: 10.1258/ebm.2009.009252
54. Li B, Pattenden SG, Lee D, et al (2005) Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18385–18390. doi: 10.1073/pnas.0507975102
55. Zampetaki A, Zeng L, Xiao Q, et al (2007) Lacking cytokine production in ES cells and ES-cell-derived vascular cells stimulated by TNF-alpha is rescued by HDAC inhibitor trichostatin A. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C1226-38. doi: 10.1152/ajpcell.00152.2007
56. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN (2009) The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* 10:32–42. doi: 10.1038/nrg2485
57. Wright EM, Loo DDF, Hirayama BA (2011) Biology of human sodium glucose transporters. *Physiol Rev* 91:733–794. doi: DOI 10.1152/physrev.00055.2009
58. Cereghini S (1996) Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J* 10:267–282.
59. Harries LW, Brown JE, Gloyn AL (2009) Species-specific differences in the expression of the HNF1A, HNF1B and HNF4A genes. *PLoS One* 4:e7855. doi: 10.1371/journal.pone.0007855
60. D'Angelo A, Bluteau O, Garcia-Gonzalez MA, et al (2010) Hepatocyte nuclear factor 1alpha and beta control terminal differentiation and cell fate commitment in the gut epithelium. *Development* 137:1573–1582. doi: 10.1242/dev.044420
61. Chen J, Li E, Zhang X, et al (2017) Genome-wide nucleosome occupancy and organization modulates the plasticity of gene transcriptional status in maize. *Mol Plant* 10:962–974. doi: 10.1016/j.molp.2017.05.001
62. Chao EC, Henry RR (2010) SGLT2 inhibition--a novel strategy for diabetes treatment. *Nat Rev Drug Discov* 9:551–559. doi: 10.1038/nrd3180
63. Terami N, Ogawa D, Tachibana H, et al (2014) Long-term treatment with the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, dapagliflozin, ameliorates glucose homeostasis and diabetic nephropathy in db/db mice. *PLoS One* 9:e100777. doi: 10.1371/journal.pone.0100777
64. Menzel R, Kaisaki PJ, Rjasanowski I, et al (1998) A low renal threshold for glucose in diabetic patients with a

- mutation in the hepatocyte nuclear factor-1 α (HNF-1 α) gene. *Diabet Med* 15:816–820. doi: 10.1002/(SICI)1096-9136(199810)15:10<816::AID-DIA714>3.0.CO;2-P
65. Farber SJ, Berger EY, Earle DP (1951) Effect of diabetes and insulin on the maximum capacity of the renal tubules to reabsorb glucose. *J Clin Invest* 30:125–9. doi: 10.1172/JCI102424
66. DeFronzo RA, Hompesch M, Kasichayanula S, et al (2013) Characterization of renal glucose reabsorption in response to dapagliflozin in healthy subjects and subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 36:3169–3176. doi: 10.2337/dc13-0387
67. Marks J, Carvou NJC, Debnam ES, et al (2003) Diabetes increases facilitative glucose uptake and GLUT2 expression at the rat proximal tubule brush border membrane. *J Physiol* 553:137–45. doi: 10.1113/jphysiol.2003.046268
68. Jabbour S, Goldstein B (2008) Sodium glucose co-transporter 2 inhibitors: blocking renal tubular reabsorption of glucose to improve glycaemic control in patients with diabetes. *Int J Clin Pract* 62:1279–1284. doi: 10.1111/j.1742-1241.2008.01829.x
69. Han S, Hagan DL, Taylor JR, et al (2008) Dapagliflozin, a selective SGLT2 inhibitor, improves glucose homeostasis in normal and diabetic rats. *Diabetes* 57:1723–1729. doi: 10.2337/db07-1472
70. Boldys A, Okopien B (2009) Inhibitors of type 2 sodium glucose co-transporters - A new strategy for diabetes treatment. *Pharmacol Reports* 61:778–784.
71. Stenlöf K, Cefalu WT, Kim KA, et al (2013) Efficacy and safety of canagliflozin monotherapy in subjects with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled with diet and exercise. *Diabetes, Obes Metab* 15:372–382. doi: 10.1111/dom.12054
72. Tosaki T, Kamiya H, Himeno T, et al (2017) Sodium-glucose Co-transporter 2 Inhibitors Reduce the Abdominal Visceral Fat Area and May Influence the Renal Function in Patients with Type 2 Diabetes. *Intern Med* 56:597–604. doi: 10.2169/internalmedicine.56.7196
73. Jurczak MJ, Lee HY, Birkenfeld AL, et al (2011) SGLT2 deletion improves glucose homeostasis and preserves pancreatic β -cell function. *Diabetes* 60:890–898. doi: 10.2337/db10-1328

74. Kurdistani SK, Tavazoie S, Grunstein M (2004) Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. *Cell* 117:721–733. doi: 10.1016/j.cell.2004.05.023
75. Pokholok DK, Harbison CT, Levine S, et al (2005) Genome-wide Map of Nucleosome Acetylation and Methylation in Yeast. *Cell* 122:517–527. doi: 10.1016/j.cell.2005.06.026
76. Kuo MH, Allis CD (1998) Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays* 20:615–626. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199808)20:8<615::AID-BIES4>3.0.CO;2-H
77. Moussaieff A, Rouleau M, Kitsberg D, et al (2015) Glycolysis-mediated changes in acetyl-CoA and histone acetylation control the early differentiation of embryonic stem cells. *Cell Metab* 21:392–402. doi: 10.1016/j.cmet.2015.02.002
78. Lafon A, Chang CS, Scott EM, et al (2007) MYST opportunities for growth control: Yeast genes illuminate human cancer gene functions. *Oncogene* 26:5373–5384. doi: 10.1038/sj.onc.1210606
79. Mosley AL, Özcan S (2003) Glucose regulates insulin gene transcription by hyperacetylation of histone H4. *J Biol Chem* 278:19660–19666. doi: 10.1074/jbc.M212375200
80. Wang Y, Wang Y, Luo M, et al (2015) Novel curcumin analog C66 prevents diabetic nephropathy via JNK pathway with the involvement of p300/CBP-mediated histone acetylation. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1852:34–46. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.11.006
81. Sun J, Wang Y, Cui W, et al (2017) Role of Epigenetic Histone Modifications in Diabetic Kidney Disease Involving Renal Fibrosis. *J Diabetes Res* 2017:7242384. doi: 10.1155/2017/7242384
82. Morais C, Westhuyzen J, Pat B, et al (2005) High ambient glucose is effect neutral on cell death and proliferation in human proximal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F401-9. doi: 10.1152/ajprenal.00408.2004
83. Cai L, Sutter BM, Li B, Tu BP (2011) Acetyl-CoA Induces Cell Growth and Proliferation by Promoting the Acetylation of Histones at Growth Genes. *Mol Cell* 42:426–437. doi: 10.1016/j.molcel.2011.05.004
84. Bielarczyk H, Tomaszewicz M, Madziar B, et al (2003) Relationships between cholinergic phenotype and acetyl-CoA level in hybrid murine neuroblastoma cells of septal origin. *J Neurosci Res* 73:717–721. doi:

10.1002/jnr.10711

85. Michno A, Raszeja-Specht A, Jankowska-Kulawy A, et al (2005) Effect of L-carnitine on acetyl-CoA content and activity of blood platelets in healthy and diabetic persons. *Clin Chem* 51:1673–1682. doi: 10.1373/clinchem.2005.050328
86. Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, et al (2009) ATP-Citrate Lyase Links Cellular Metabolism to Histone Acetylation. *Science* (80-) 324:1076–1080. doi: 10.1126/science.1164097
87. Kaur H, Chen S, Xin X, et al (2006) Diabetes-induced extracellular matrix protein expression is mediated by transcription coactivator p300. *Diabetes* 55:3104–3111. doi: 10.2337/db06-0519
88. Xu B, Chiu J, Feng B, et al (2008) PARP activation and the alteration of vasoactive factors and extracellular matrix protein in retina and kidney in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 24:404–412. doi: 10.1002/dmrr.842
89. Yoshikawa M, Hishikawa K, Marumo T, Fujita T (2007) 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. doi: 10.1681/ASN.2005111187
90. Noh H, Oh EY, Seo JY, et al (2009) Histone deacetylase-2 is a key regulator of diabetes- and transforming growth factor- 1-induced renal injury. *AJP Ren Physiol* 297:F729–F739. doi: 10.1152/ajprenal.00086.2009

試薬一覧

10%-Formaldehyde Neutral Buffer Solution	Nacalai Tesque
10×H buffer	TaKaRa
10×L buffer	TaKaRa
10×M buffer	TaKaRa
2.5 mM dNTPs	TaKaRa
2×Rapid Ligation Buffer	Promega
2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris)	Wako pure chemical industries
2-mercaptoethanol	Wako pure chemical industries
2-Propanol	Wako pure chemical industries
5×Prime STAR [®] GXL Buffer	TaKaRa
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside (X-gal)	Tokyo Chemical Industry
Acrylamide	Wako pure chemical industries
Agarose S	NIPPON GENE
Amersham ECL [™] Select Western Blotting Detection System	GE Healthcare
Ammonium Peroxodisulfate	Wako pure chemical industries
Ampicillin sodium salt	Wako pure chemical industries
AmpliTaq Gold [™] DNA Polymerase	Applied Biosystems
Anhydrous ethanol	Wako pure chemical industries
Anti-acetyl-Histone H3 (Lys9) Antibody	EMD Millipore
Anti-beta Actin antibody	Abcam
Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep	GE Healthcare
BigDye [™] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Bromophenol blue	Nacalai Tesque
Can Get Signal [®] Immunoreaction Enhancer Solution	TOYOBO
Click-iT [®] Nascent RNA Capture Kit	Invitrogen
CutSmart [®] Buffer	New England Biolabs
Deproteinizing Sample Preparation Kit	BioVision
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Wako pure chemical industries
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich
DMEM, no Glucose	Gibco
DMEM: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12)	Gibco
Donkey anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz
DpnI	New England Biolabs
Dual-Luciferase [®] Reporter Assay System	Promega
EcoRI	TaKaRa
EcoRV	TaKaRa

ECOS™ Competent E. coli JM109	NIPPON GENE
Epigenase™ HDAC Activity/Inhibition Direct Assay Kit (Fluorometric)	Epigentek
EpiQuik™ Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Kit	Epigentek
EpiQuik™ Tissue Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Kit	Epigentek
EpiScope® Nucleosome Preparation Kit	TaKaRa
Ethidium bromaide	NIPPON GENE
Ethylene diamine tetra acetate (EDTA)	Wako pure chemical industries
Fetal bovine serum (FBS)	Invitrogen
FuGENE® HD Transfection Reagent	Promega
Gene RED PCR Mix	NIPPON GENE
Glucose Solution	Gibco
Glycerol	Wako pure chemical industries
Glycine	Wako pure chemical industries
Ham's F-12 Nutrient Mixture	Gibco
HCl	Wako pure chemical industries
HEPES	MP Biomedicals
HindIII	TaKaRa
HNF-1 α Antibody (C-19)	Santa Cruz
HNF-1 α Antibody (F-7)	Santa Cruz
illustra™ Sephadex™G-50 DNA Grade F	GE Healthcare
Immobilon-P PVDF Membrane	EMD Millipore
In-Fusion® HD Cloning Kit	TaKaRa
Isopropyl β -D-1- thiogalactopyranoside (IPTG)	TaKaRa
ISOSPIN Cell & Tissue RNA	NIPPON GENE
KCl	Wako pure chemical industries
KH ₂ PO ₄	Wako pure chemical industries
KpnI	TaKaRa
LB Agar Daigo	Wako pure chemical industries
LB Broth Daigo	Wako pure chemical industries
MeOH	Wako pure chemical industries
MgCl ₂	Wako pure chemical industries
Multi-Screen® Filtration System	EMD Millipore
N,N'-Methylenebis(acrylamide)	Invitrogen
Na ₂ HPO ₄	Wako pure chemical industries
NaCl	Wako pure chemical industries
NaOH	Wako pure chemical industries
NOMe-Seq	Active Motif
Nonidet P-40	Wako pure chemical industries

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	TaKaRa
NucleoSpin® Plasmid QuickPure	TaKaRa
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium	Gibco
pcDNA™3.1 (+)	Invitrogen
p-GEM®-T Easy Vector	Promega
pGL4.10 [<i>luc2</i>] Vector	Promega
pGL4.70 [<i>hRluc</i>] Vector	Promega
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	Wako pure chemical industries
Phosphate buffered saline powder, pH 7.4, for preparing 1 L solutions	Sigma-Aldrich
PicoProbe™ Acetyl CoA fluorometric Assay Kit	BioVision
Potter-Eleghjem Tissue Glinder	WHEATON
Pre-stained Protein Marker	Nacalai Tesque
Prime STAR® GXL DNA polymerase	TaKaRa
Protease inhibitor cocktail (PIC)	Sigma-Aldrich
Protein Assay Bicinchoninate Kit	Nacalai Tesque
QIAfilter Plasmid Midi Kit	QIAGEN
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen
ROX Reference Dye (50×)	TaKaRa
S.O.C. medium	Invitrogen
Skim Milk Powder	Wako pure chemical industries
Sodium deoxycholate	Wako pure chemical industries
sodium dodecyl sulfate (SDS)	Wako pure chemical industries
SYBR® Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (2×)	TaKaRa
T4 DNA Ligase	Promega
TBE (Tris-Borate EDTA) powder	TaKaRa
Trichostatin A	Wako pure chemical industries
TrypLE™ Express Enzyme (1X), no Phenol Red	Invitrogen
Tween® 20	Invitrogen
UltraPure™ Glycogen	Invitrogen
UltraPure™ TEMED	Invitrogen
Verso cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific
λ- <i>Eco</i> T14 I/ <i>Bgl</i> II digest	TaKaRa
φX174DNA/ <i>Hae</i> III digest	TaKaRa

謝辞

本研究の遂行ならびに本博士論文の執筆にあたり、ご指導・ご協力を頂き、大変お世話になった多くの方々に厚く御礼申し上げます。

本研究を行う機会を与えてくださり、終始懇切な御指導・御助言を賜りました 九州大学大学院薬学研究院薬物動態学分野 家入 一郎 教授 に深厚なる謝意を表します。

本研究の遂行ならびに本博士論文の作成に当たり、終始有益な御助言と温かい御指導・御鞭撻を賜りました 九州大学大学院薬学研究院薬物動態学分野 廣田 豪 准教授 に厚く御礼申し上げます。

本論文を査読していただき、貴重な御助言と御校閲を賜りました 九州大学大学院薬学研究院薬剤学分野 大戸 茂弘 教授 ならびに 九州大学大学院薬学研究院グローバルヘルスケア分野 松永 直哉 准教授 に謹んで感謝致します。

本研究の遂行において、有益な御助言と御支援を賜りました 九州大学医学研究院教育・研究支援センター 中村 崇規 先生 ならびに 諸先生方 に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、多大なる御尽力を賜りました 九州大学薬学部薬物動態学分野 舘村 真美学士、渡嘉敷 彩音 氏 に深く感謝致します。

本研究に対し、温かい御支援を賜りました 九州大学大学院薬学府 ならびに 九州大学薬学部薬物動態学分野 諸氏 に心から感謝致します。

最後に、学生生活を通して、多大なる理解と惜しめない支援を頂いた家族に心から感謝の気持ちと御礼を申し上げます。