

令和元年6月17日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19669

研究課題名(和文) アクアポリン2を用いた低出生体重児の尿細管機能障害と慢性腎障害の病態解明

研究課題名(英文) Investigation of tubular dysfunction and chronic kidney injury in low birth weight infants with aquaporin 2

研究代表者

遠藤 周 (ENDO, AMANE)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：60772457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、低出生体重児の腎機能についての研究が進んでいる。しかし、これらの研究の主眼は糸球体障害に置かれている。腎機能において糸球体機能のみならず尿細管機能は重要であり、子宮内発育遅延が尿細管に及ぼす影響を、水チャネルであるAQP2を用い検証した。子宮内発育遅延モデルラットを用い、尿細管機能を検討した。生後8週において尿浸透圧に有意差を認めなかったが、免疫染色による腎組織評価において尿細管のAQP2の発現が低下していた。これらの結果より、子宮内発育遅延が尿細管障害を引き起こすことや、濃縮力障害に先立ってAQP2の発現が低下している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果より、子宮内発育遅延が尿細管機能障害やAQP2の発現の低下を引き起こす可能性が明らかとなり、これらの成果は今後の早産・低出生体重児の尿細管機能研究において重要な知見と考えられる。また、研究が進むことで早産・低出生体重児における腎障害の早期発見・対策・治療に繋がり、将来の腎不全の進行や透析導入を遅らせることが可能となる。それは児の生活の質の向上だけでなく、医療費の1/30(年間約1兆円)を占める透析医療費の削減に貢献するものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Recently, research on renal function of low birth weight infants has been advanced. However, the main focus of these studies is on glomerular disorders. Not only glomerular function but also tubular function are important in renal function. We examined the damage that intrauterine growth retardation exerts on tubules with AQP2 (water channel). We examined tubular dysfunction in intrauterine growth retardation model rats. Although there was no significant difference in urinary osmolality at 8 weeks of age, expression of renal AQP2 was reduced in renal tissue evaluation by immunostaining. These results suggest that intrauterine growth retardation may cause tubular dysfunction and that the expression of AQP2 may be reduced prior to urinary concentration impairment.

研究分野：小児科学

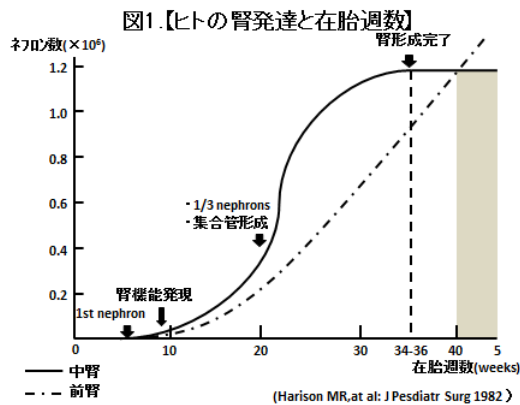
キーワード：尿細管機能 早産・低出生体重児 慢性腎障害 アクアポリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年のめざましい新生児医療の進歩に伴い、早産・低出生体重児として出生する新生児が先進国を中心に増加している。本邦の人口動態統計(昭和50年～平成21年)によると、全出生数に対して低出生体重児が占める割合は、昭和50年の5.1%に対し平成21年は9.6%と、この30年間でおよそ2倍に増加しており、この割合は今後も増加することが予想されている。これらの早産・低出生体重で出生した新生児において、遠隔期のメタボリック症候群発症のリスクが上がるというBaker仮説が提唱された(Barker DJ, et al. Lancet.1986)。その後現在までに成長後の種々の臓器障害発症リスクが明らかとなり、DOHaD(Developmental origins of health and disease)概念として確立されている(Gluckman PD, et al. Science. 2004)。

「腎臓」に関しては、機能的単位であるネフロン数は母体内で在胎36週頃まで増加するが、それ以前に出生した早産児は生まれつきのネフロン数の少なさが原因となり個々の残存糸球体への過剰な負担が生じる。その結果、成長後の遠隔期になって糸球体硬化病変発症や「慢性腎臓病(CKD)」を生じると考えられている(Brenner BM, et al. Am J Kidney Dis.1994)。



ヒトの腎発達(図1)は、胎生期に前腎・中腎と順に出現し、最終的に腎臓が形成される。尿の産生は在胎9～12週頃から始まり、20週にはネフロン数は成人の約1/3にすぎない。その後、在胎34-36週には腎形成は完了する。よって早産児は正常産児よりも出生時のネフロン数が少なく、さらに生後の循環・栄養・薬剤等の後天因子によって生後のネフロンの形成が阻害されると、総糸球体数が減少したままとなると考えられている。

近年これらの早産・低出生体重児の腎機能についての研究が進んでおり、我々の研

究グループでも、極低出生体重児の慢性腎障害のマーカーとして尿中アンギオテンシノーゲンが有用であること(Nishizaki N, et al. Clin Exp Nephrol. 2014)や、子宮内発育遅延モデルラットにおいて腎機能障害に先駆けて尿中アンギオテンシノーゲンが上昇すること(Murano Y, et al. Pediatr Res. 2015)を報告してきた。しかし我々含め、現時点では「糸球体障害」にこれらの研究の主眼が置かれている。

一方で、新生児期の尿濃縮力は低く、2歳頃までに成人同様の尿濃縮力に達することが知られている。系統発生と尿濃縮力機構の獲得を考えると、海水魚から淡水魚・両生類・爬虫類・鳥類と進化の過程で腎髄質にヘンレループが出現し、尿を濃縮することが可能となった。哺乳類では異なるループを組み合わせることで尿濃縮力がさらに発達を遂げた。

個体発生における尿濃縮力機構の獲得は、太いヘンレループが生後のアポトーシスによって細かい分節に変化し、成熟していくことが知られている(kim J, et al. Am J Physiol. 1996)。また腎髄質部集合管では出生時にはAVP感受性の尿素再吸収機構が未発現で、離乳期にこの尿素輸送が完成することがわかっている(Liu W, et al. Kidney Int. 2001)。このように新生児期に、髄質が形態学的にも機能的にも変化を起こし、尿濃縮力を獲得していくことは新生児期に尿濃縮力が未成熟である理由として重要と考えられる。

アクアポリン2(AQP2)は約300のアミノ酸から成る比較的小さな膜蛋白で、腎臓の集合管に発現し尿濃縮に大きな役割を担っている。水分子のみを通す水チャネルであり、体内水分量調節を行っている。体内が脱水になるとバソプレシン刺激を受けてAQP2は細胞内から細胞表面に移動し、原尿から水のみを再吸収し尿を濃縮する。AQP2の遺伝子異常が起こると腎性尿崩症を発症することが知られている。つまりAQP2の働きが何らかの理由で阻害された状況では、尿濃縮力障害が起こる。臨床の現場で頻度の多い問題である水利尿不全(浮腫、心不全、腹水)との関連も報告されている。本研究では臨床像や尿細管機能を反映するバイオマーカーとしてAQP2を用いる。

2. 研究の目的

早産・低出生体重児が尿細管機能の発生において、糸球体だけでなく尿細管・間質にも何らかの影響を受けていることは予測される事であり、その詳細な検討を行うことや、成長後に及ぼす影響を解明することが本研究の目的である(図2)

(1) 低出生体重ラットに対し「アクアポリン2(AQP2)」を用いて尿細管機能評価を行い、出生後の尿細管機能の推移や出生後合併症との関係を明らかにすること。

早産・低出生体重児と尿濃縮力障害を考える際には、「急性期」においてはその未熟性によって血圧低下・循環不全・胎便性イレウス等との関連がある可能性がある。これらの臨床像とアクアポリン2の関わりを検討した研究はない。これらの病態を明らかにすることができれば、新生児医療の新たな治療法の開発につながるものと考えられる。

(2) 動物実験を通じて未熟児ラットにおける尿細管機能の推移や、遠隔期における慢性腎障害との関係を明らかにすること。

(3) これらの病態を解明することで、新生児医療における新たな治療法の開発や、慢性腎障害の早期発見・対策により患児のQOL向上や透析医療費の削減に貢献すること。

早産・低出生体重児と「慢性期腎障害」を考える際、現時点では「糸球体障害」に研究の主眼が置かれている。早産・低出生体重児の腎発生において、糸球体同様に尿細管間質も何らかの影響を受けるはずであり、その詳細を検討した研究はない。これらの関係を明らかとし、その病態を解明することができれば、腎障害の早期発見・対策・治療に繋がり、将来の腎不全の進行や透析導入を遅らせることが可能となる。それは児のQOL向上だけでなく、医療費の1/30(年間約1兆円)を占める透析医療費の削減に貢献するものと考えられる。

3. 研究の方法

子宮内発育遅延モデルラットを作成し、出生後からの尿細管機能の推移を調べ、また尿細管機能障害が慢性腎障害 (CKD) にどのように影響するか解明する。

【動物実験】

確定妊娠 Sprague-Dawley ラットを購入 (Nihon SLC, Co., Ltd. Shizuoka, Japan) し、これらを動物実験施設 (気温 24~25、相対湿度 60%、12 時間毎の明暗サイクル、水分フリーアクセスの水分・食餌) の同じ室内の個々のケージに収容した。

妊娠 18 日目に子宮動脈を結紮することにより、子宮内発育遅延モデルラット (IUGR 群) を作成した。

イソフルラン吸入麻酔下 (4-5% で導入し、2-3% を目安に維持) に外科剪刀で皮膚に小切開を加えたのちに腹部の皮膚を正中切開し、腹直筋にも正中切開を加え、子宮動脈を 6-0 シルク糸で結紮を行った。結紮後、腹直筋ならびに皮膚を縫合した。術野の消毒はエタノールで行った。処置時間は、1 匹あたりおよそ 10 分以内とした。処置後はラットが覚醒するまで術者が注意深く観察したのちにケージに戻し、自然分娩で仔ラットの出生を待った。

対照群として、外科処置を行うも子宮動脈の結紮を行わないシャム手術群も作製した。仔ラット出生後は、母ラットによる母乳哺育を行った。作成した仔ラットについて、以下のように測定、検体採取を行った。IUGR 群、対照群 (シャム手術群) と合わせて合計 20 匹のラットを使用した。

- (1) 出生後 4 週、8 週、12 週、16 週、20 週、24 週に体重測定を行う。
- (2) 採尿ケージを用いて、ラットの採尿を出生後 4 週、8 週、12 週、16 週、20 週、24 週に行う。
- (3) 生後 24 週で、腎臓検体の採取を行い、免疫染色標本を作製する。

【評価】

- ・対照群と比較した実験群仔ラットの体重の相違を検討する。
- ・採尿：BUN, Cre, 電解質 (Na, K), アルブミン, 浸透圧, 2MG, NAG, 糖, AQP2
- ・採血：BUN, Cre, 電解質 (Na, K), 2MG, シスタチン C (CysC), 糖, を用い、尿細管機能・腎機能の推移を数値化する。
- ・組織学的検討：腎臓組織はホルマリン固定 (HE 染色・PAS 染色・MT 染色用・免疫染色用) 凍結保存、RNA 解析用保存等、の方法で保存する。その後免疫染色を行い、AQP2 の腎内分布の評価および western blot 法を用いて組織中の AQP2 の定量解析を行う。

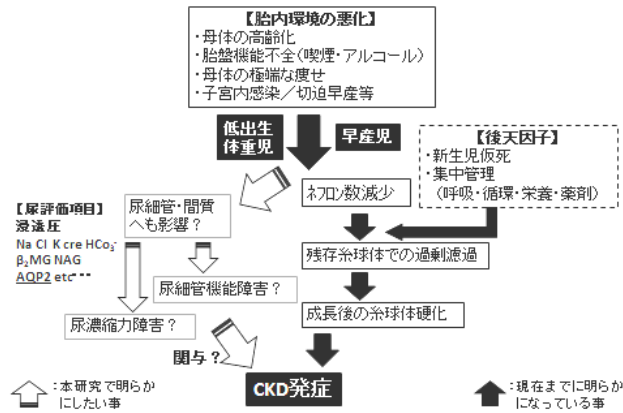
なお、これらの実験方法は実験動物に対する除痛や環境整備等の倫理的配慮を充分に行い、施設内の疾患モデル研究センターに申請し承認を得た。

4. 研究成果

結果：子宮内発育遅延モデルラット (IUGR 群) を用い、尿細管機能を評価するため検討を行った。

出生体重の評価を行った。各群の出生体重は IUGR 群: $5.64 \pm 1.29\text{g}$ 対照群 $10.32 \pm 1.13\text{g}$ ($P < 0.01$) と有意差を認めた。尿浸透圧の評価を行った。各群の尿浸透圧 ($\text{mOsm/kg} \cdot 8$ 週) は IUGR 群: 1257.6 ± 273.9 対照群: 1148.6 ± 367.0 ($P=0.4$) と有意差を認めなかった。血清 cre の評価を行った。各群の血清 cre ($\text{mg/dl} \cdot 8$ 週) は IUGR 群: 0.253 対照群: 0.257 ($P=0.45$) と有意差を認めなかった。尿中 2MG の評価を行った。各群の尿中 2MG (ng/mg Cr) は IUGR 群: $86.6 \pm$

図2.【DOHaD理論に基づく未熟児と慢性腎臓病(CKD)発症過程】



19.7 対照群: 52.7 ± 16.1 ($P < 0.01$)と有意差を認めた。

続いて腎組織評価を行った。組織評価は免疫染色および組織の蛋白発現に関する検討を行った。免疫染色では対照群に比べ IUGR 群の AQP2 の発現が低下していた。しかし AQP2 の発現を Western Blotting において確認をしたところ、IUGR 群: 0.94 ± 0.37 対照群 1 ± 0.36 ($P = 0.36$)と、これらの発現に有意差は認められなかった。

考察: 子宮内発育遅延モデルラットの作成に際し、実験当初は結紮部位からの距離によって仔ラットの体重に不安定があり、安定作成に時間を要した。特に結紮部位の近位部で子宮内死亡や極端な低出生仔ラットが出生した。より生理的な子宮内発育遅延モデルラットの作成のために子宮血流の阻害方法を一時コイル法(アコイド・コンストラクター)に変更したが、血流阻害が弱く IUGR 群と対照群の体重に有意差が出ず、最終的には当初の計画通りの結紮法の見直し・作成技術向上を行い、均一な体重差を得た。これらの検体を用い、評価を行った。

尿浸透圧・血清 cre において両群に有意差は認められなかった。これらの結果は予備実験でも判明していた事象であり、従来の評価法では急性期には糸球体機能障害および尿細管機能障害を捉えることを難しいことを示している。一方で同時に施行した組織の免疫染色においては対照群に比べ IUGR 群の AQP2 の発現が低下していた。尿中低分子蛋白とその相関も認められ、これらの結果を合わせると、従来のバイオマーカーでは捉えることが困難な尿細管障害も AQP2 や低分子蛋白を組み合わせる事で、より早期に検出できる可能性が示唆された。

またこれらの組織において AQP2 の発現を Western Blotting において確認をしたところ、有意差を得ることができなかった。これらの解離に関しては現在調査検証中であるが、これまでの結果より、IUGR ラットにおいて AQP2 の発現に障害が起こっている可能性が示唆され、これらの成果は今後の早産・低出生体重児の尿細管機能研究において重要な知見と考えられる。より有意な結果を得られるために、遠隔期(32週等)へ実験期間を延長することも検討している。これらの結果が揃い次第、論文化する計画である。

またその他の成果としては今回、腎組織における免疫染色における AQP2 の発現と Western Blotting における蛋白発現に解離が認められたが、原因として RNA レベルから蛋白の発現に至る過程において、何らかの阻害物質が関与している可能性が考えられた。これらの追加検証が、今後本研究を発展させる可能性も示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

Hara T, Ohtomo Y, Endo A, Nijima S, Yasui M, Shimizu T. Evaluation of Urinary Aquaporin 2 and Plasma Copeptin as Biomarkers of Effectiveness of Desmopressin Acetate for the Treatment of Monosymptomatic Nocturnal Enuresis. *J Urol* 198:921-7.2017

Nakagawa M, Nishizaki N, Endo A, Someya T, Saito Y, Mizutani A, Hara T, Murano Y, Sakuraya K, Hara S, Umino D, Hirano D, Fujinaga S, Ohtomo Y, Shimizu T. Impaired nephrogenesis in neonatal rats with oxygen-induced retinopathy. *Pediatr Int* 59:704-10.2017

Murano Y, Shoji H, Hara T, Ikeda N, Endo A, Nishizaki N, Shimizu T. Long-term renal tubular damage in intrauterine growth-restricted rats. *Pediatr Int* 60:565-8.2018

遠藤 周, 水谷 亮, 原 太一, 仲川 真由, 原 聡, 青柳 陽, 大友 義之, 清水 俊明, 消化器疾患との鑑別を要した間欠性水腎症の2例、日本小児腎不全学会雑誌 37:256-8、2017

[学会発表](計23件)

東海林 宏道, 村野 弥生, 池田 奈帆, 遠藤 周, 西崎 直人, 清水 俊明、子宮内発育不全ラットの尿メタボローム解析についての検討、日本小児科学会学術集会、2016

Mizutani A, Endo A, Gonda Y, Nakagawa M, Ohtomo Y, Shimizu T. The effect of Hydrogen-rich water intake on renal fibrosis in unilateral ureteral obstruction rats. 13th Asian Congress of Pediatric Nephrology, Kuala Lumpur, Malaysia. 2017

平井 沙依子, 中野 聡, 箕輪 圭, 村野 弥生, 遠藤 周, 春名 英典, 鈴木 光幸, 清水 俊明、非アルコール性脂肪性肝疾患と慢性腎臓病の発症に DOHaD 仮説の関与が考えられた学童例、日本小児科学会学術集会、2018

遠藤周, 水谷亮, 仲川真由、本症例は NSAKI か? 第8回御茶ノ水小児腎カンファレンス、2017

水谷 亮, 遠藤 周, 村野 弥生, 藤永 周一郎, 大友 義之, 清水 俊明、

片側尿管結紮モデルラットにおける分子状水素の腎線維化抑制効果と Klotho 遺伝子の検討、日本小児腎臓病学会学術集会、2018

[図書](計2件)

遠藤周、腎尿路疾患 [33] 尿路感染症、小児科外来処方マニュアル.清水俊明/田久保憲行(編)、医学書院.106-8、2018

遠藤周、腎尿路疾患 [34] ネフローゼ症候群、小児科外来処方マニュアル.清水俊明 / 田久保憲行 (編) 医学書院.109-11、2018

[その他]

ホームページ等

<https://www.juntendo.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

(2)研究協力者

研究協力者氏名 : 仲川 真由

ローマ字氏名 : NAKAGAWA , mayu

研究協力者氏名 : 原 太一

ローマ字氏名 : HARA , taichi

研究協力者氏名 : 水谷 亮

ローマ字氏名 : MIZUTANI , akira

研究協力者氏名 : 村野 弥生

ローマ字氏名 : MURANO , yayoi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。