

令和元年6月24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：16K19694

研究課題名(和文) 低出生体重児モデルラットにおいてARBは腎機能障害を抑制する

研究課題名(英文) ARB inhibits kidney dysfunction in intrauterine growth restricted rat offspring

研究代表者

村野 弥生 (Murano, Yayoi)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：80771922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓の糸球体が未熟なまま出生した子宮内発育遅延児では将来的に巣状糸球体硬化症を来すと言われている。一方、この巣状糸球体硬化症に対してはアンギオテンシノーゲン受容体拮抗薬(ARB)の投与が行われているが、その効果が子宮内発育遅延児でも認められるかは不明であった。そのため子宮内発育遅延児のモデルをラットで作製し、それにARBを投与することで腎機能障害が抑制されるかを検討した。子宮内発育遅延モデルでは正常のラットと比較して腎機能障害を来していたが、子宮内発育遅延児にARBを投与したところ、その腎機能障害の程度が改善していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児医療の進歩に伴いこれまで救命されなかった未熟な児が救命されつつある。しかしこれらの児では救命がゴールではなく、成長後も様々な臓器で健康被害を呈することが報告されている。腎臓の分野では腎臓の糸球体に負荷がかかることにより、巣状糸球体硬化症の病像を呈することが報告されているがその治療法は確立していない。一方、一般的には巣状糸球体硬化症にはアンギオテンシノーゲン受容体拮抗薬(ARB)が用いられる。そのため、これらの児でARBが成長後の腎障害が抑制されることが分かったため、今後、これらに児に対して治療の選択肢になりうると思われた。

研究成果の概要(英文)：Infants who born premature are said to have premature kidney and result in focal segmental glomerular sclerosis. In terms of focal segmental glomerular sclerosis in other patients, angiotensinogen receptor blocker (ARB) are commonly used and its effectiveness is reported. However, few things are known about effectiveness of ARB in infants born intrauterine growth restricted. Therefore, we made intrauterine growth restricted rat model and gave them ARB. From 14 weeks after birth to 32 weeks after birth, we gave them ARB and terminated. We evaluate their kidney tissue and found that their kidney dysfunction was inhibited in intrauterine growth restricted rats when they took ARB.

研究分野：新生児学

キーワード：DOHaD 巣状糸球体硬化症 ARB IUGR

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、新生児医療の進歩に伴い、これまで救命されなかった児が救命されるようになっていく。出生後の急性期の全身管理については、人工呼吸管理や栄養方法について様々な研究がされており、救命率の進歩は著しく、2014年には、本邦における500から750グラムで出生した児の生存率の劇的な改善が報告された。しかし、それらで救命された児の成長後の健康障害については1980年にBarkerらが報告した「低出生体重で出生した児では成長後の心血管疾患の危険性が増加する」という「Barker仮説」が発表されて以来、様々な研究を経て、近年「低出生体重児で出生した児では将来的に生活習慣病をはじめとした様々な臓器障害を呈する」というDOHaDの概念が確立されたばかりである。しかし1980年代に人工サーファクタントが開発されてから、救命される児の在胎週数は劇的に短くなり、子宮内発育遅延を呈する児をはじめとしたより未熟な児が救命されるようになった。そして、近年、このころから救命されはじめた児が次々と20代、30代に達し、DOHaDの概念に基づくと思われる病態を呈する報告が症例報告を中心に相次いでいる。そのため、低出生体重で出生した児の成長後の健康障害の実態の解明とそれに対する治療法の確立は急務である。

DOHaDの概念に基づき、腎臓では腎臓の発生過程で生まれたまたは腎臓の発生が未熟であったために、生まれながらにして腎臓の糸球体数が少ないことが原因となり、一つ一つの糸球体に負担がかかる過濾過の状態になり、糸球体の腫大、高血圧を来すとされている(Brennerら)。我々は子宮内発育遅延(IUGR)モデルラットにおいて、この過濾過の原理に基づくと考えられる腎機能障害を呈することを過去に報告した(Murano et al. *Pediatr Res* 2014)。その報告の中で、IUGRラットは32週齢の時点で、腎機能障害を認め、組織学的には巣状糸球体硬化症に類似した所見とされる、糸球体の硬化(硬化indexの上昇)と糸球体径の拡大の所見を呈することを報告した。一方、臨床的には巣状糸球体硬化症の像を呈する患者ではアンジオテンシノーゲン受容体拮抗薬(ARB)の有効性が報告されており、DOHaDの概念に基づく腎機能障害を呈した児でもARBが治療に用いられることが多い。しかし、一般的な巣状糸球体硬化症ではARBの有効性は証明されていても、IUGRに由来する巣状糸球体硬化症ではARBの有効性は証明されていない。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえて、IUGRで出生した児においてARBがその腎機能障害の進展の抑制に効果的かを調べることを目的とし、IUGRモデルラットにARBを投与し、腎機能障害が抑制されるかを調べることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) IUGRモデルラットの作製

IUGRモデルラットは、上記に記載したわれわれのIUGRモデルラットにおいて遠隔期に腎機能障害を呈することが証明された論文(Murano et al. *Pediatr Res* 2014)と同じ手法を用いて作製した。

まず、妊娠13日目のSDラットを購入し、飼育室の環境に十分慣らせたうえで、妊娠18日目に全身吸入麻酔下に開腹し、子宮を体外に取り出し、両側の子宮動静脈を同定し、それぞれ糸で結紮することで人工的に子宮内の血流低下による低酸素を惹起し、子宮内の環境を悪化させた。その後、閉腹し、妊娠22日目から23日目の間に自然経膈分娩で分娩させた。このようにして作製した仔ラットをIUGRラット、一方、母体の開腹のみで子宮動静脈にはなにも処置をしない、偽手術で自然分娩させた仔ラットをshamラットとした。

(2) IUGRモデルラットの成育

自然分娩で出生した仔ラットは体重を測定したのち、母ラットに母乳哺育をしてもらい、4週齢まで飼育した。4週齢に達したのちは母ラットと分離し、その中からオスのみを選び、それぞれ1ケージあたり2-3匹で成育を継続した。成育中、エサと水分は自由にアクセスできるようにしたが、ラットにおいて腎臓の糸球体の形成が終了すると報告されている14週齢からARB投与群には飲料水にARB(ロサルタンナトリウム)を混入した(ARBは腎臓の発生過程で投与すると発生に影響するがラットは14週まで腎臓の発生が継続するという報告があり、14週以降に投与を開始した)。このようにしてIUGR+通常水投与群、IUGR+ARB投与群、Sham+水投与群、Sham+ARB投与群の4群をそれぞれ作製した。いずれの群もARB投与以外は同等の条件で32週まで成育したのち解剖を行った。

また、飼育中、4週毎に体重測定と尿検査を施行した。尿検体の収集はラットの専用の採尿ケージを用いて24時間蓄尿を行った。採取した尿は1500回転、10分で遠心して上澄みを保存容器に回収したのち20℃の冷凍庫に保存した。

(3) 検体採取

腎機能障害の評価

4週毎の尿検体を採取し、それぞれ尿蛋白・尿中クレアチニンを測定したほか、β2MG(ミクログロブリン)、Cys-c(シスタチンC)、Calbindinといった尿細管機能障害のマーカーの測定も行った。

われわれのこれまでの報告では尿蛋白・尿中クレアチニンには 32 週まで有意差が生じない (Murano et al. Pediatr Res 2014))。しかし、IUGR ラットでの尿細管機能障害の報告は調べた限りでは見当たらなかった。

腎臓組織の評価

32 週まで飼育したのちに、4 群のラットの腎臓の組織をそれぞれ採取した。採取の際には全身吸入麻酔下でラットを眠らせ、開腹して大動脈から採血し、生理食塩水で十分還流したのちに組織を採取した。免疫染色用の組織は腎臓を半分に分けてホルマリンにつけて常温に保存した。リアルタイム PCR (RT-PCR)用の組織は細かく刻んで専用の液 (RNAlater)に保存し、-20 の冷蔵庫に保管した。

その後、RT-PCR 法を用いて α SMA, TGF β , desmin, UCP2, IL18 の RNA の発現量の測定を行い、免疫組織染色ではこれらと同様の項目で免疫染色を行って蛋白の発現量を測定した。また、HE 染色された標本を用いて糸球体硬化の程度の評価 (糸球体硬化 index) と糸球体径の測定を行った。

4. 研究成果

(1) IUGR ラットの作製

子宮動脈を結紮した IUGR 群では偽手術を行った Sham 群と比較して有意に出生体重が抑制されていた。その後の 4 週毎の体重測定では両群間の体重の有意差は 8 週で消失した。以降は両群間に体重の有意差を認めていない (これは DOHaD の概念に基づき、出生時の体重は低かったがその後体重増加を認めたと評価されるが、その後に IUGR 群の体重が増加して両群間に有意差を生じなかった理由としてはラットの体重そのものがプラトーに達したためと考えている)

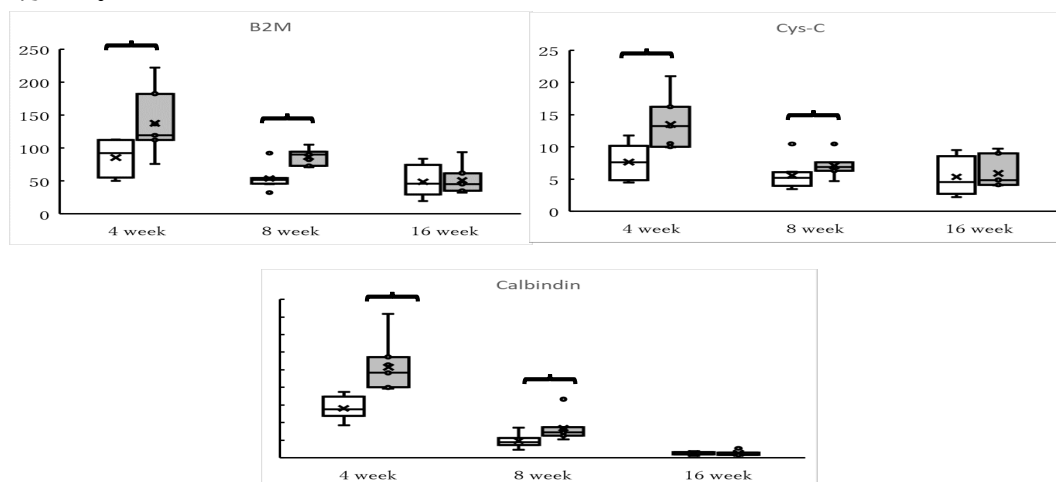
(2) IUGR ラットの成育

IUGR ラットの成育は特に問題なく行った。飼育中に IUGR + ARB 投与群が 1 匹死亡、解剖中に IUGR + ARB 群と Sham + 水群がそれぞれ 1 匹死亡したが、前者は同一ケージ内のラットともみ合いになり死亡し、後者は解剖手技の未熟性 (麻酔を深くしすぎたことと、血管穿刺を失敗したことによる) によるものであり、IUGR や ARB 投与に関係するものではないと判断している。最終的に検体採取できたラットは IUGR + ARB 群 6 匹、IUGR + 水群 7 匹、Sham + ARB 群 8 匹、Sham + 水群 9 匹であった。

(3) 検体採取

生後 16 週までの尿細管機能の評価

IUGR ラットを成育していく過程で 4 週毎に体重測定と尿検査を施行したが、経過中に尿検体を用いて尿蛋白および尿中クレアチニン値を測定した。過去のわれわれの報告と同様に蛋白とクレアチニンに有意差を生じなかったが、これら糸球体障害のマーカーだけでなく、尿細管機能障害のマーカーも測定することとしたところ、下記のように β 2MG, Cys-c, Calbindin の全ての値が IUGR 群と Sham 群間で有意差をもって異なっていた他、下記のように時系列に変化を認めた。このように IUGR ラットにおいてこれまでわれわれが報告してきた糸球体障害以外にも尿細管障害を呈することが分かったため、ラットは成育中であったため組織学的な評価はできなかったが、バイオマーカーの変化のみ、最終結果に先立って学会で報告を行い、論文作成を行った。



32 週の腎機能の評価

32 週齢に達したのちに採取した腎組織ではまず初めに RT-PCR で RNA 量の測定を行った。 α SMA, TGF β , desmin, UCP2, IL18 を測定したところ、 α SMA, TGF β が IUGR 群で Sham 群と比較して高値であり、IUGR + 水群と IUGR + ARB 投与群間で比較した際にも、 α SMA, TGF β で有意差を認めた。また同様の項目で免疫染色を行ったところ、 α SMA, TGF β で有意差を認めるという結果であった。HE 染色標本における糸球体の形態学的な評価では、糸球体径には有意差を認めなかったが、糸球体硬化 index は IUGR 群の中で、水投与群と ARB 投与群で有意差を認めた。

現在、それぞれの標本で CD68 の染色、マクロファージの浸潤について追加検討を行っており、これらの結果が揃ったら、日本周産期新生児学会、日本小児腎臓病学会で発表し、英文雑誌に投稿予定である。

これまでのわれわれの研究では、IUGR で出生したことにより未熟な糸球体をもって生まれ、それが時間経過とともに過濾過により障害され、最終的に巣状糸球体硬化症へ至るプロセスをレニンアンジオテンシン系の亢進という観点から考察した。そこで今回の研究では ARB を投与することでその亢進しているレニンアンジオテンシン系を抑制し、糸球体障害の進行を遅らせることができるのではないかと考え、検討を行ったところ、ARB 投与により糸球体障害が抑制される可能性が示唆された。そのため IUGR で出生し、腎機能障害を呈した児では ARB が有効であると考えられるが、ラットでの検討であり、ヒトへの応用は慎重に行わなければならないと考えている。また、実験対象がオスのみであることからメスで同様の結果を得ることができるかを確認していく必要がある。更に、実際にヒトへ応用する場合、ARB は胎児の腎臓の発生に関与するレニンアンジオテンシン系を抑制することで腎臓の発生を阻害し、催奇形性を来たす (ARB fetopathy) と言われており、特に妊娠可能な時期の女性では投与を慎重に行わなければならない。そのため、今後はラスベラトールや水素水など副作用の少ないと言われる薬物でも今回と同様の実験を行っていきたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Long-term renal tubular damage in intrauterine growth-restricted rats

Yayoi Murano, Hiromichi Shoji, Taichi Hara, Naho Ikeda, Amane Endo, Naoto Nishizaki and Toshiaki Shimizu

Pediatr Int 2018 60:565-568

〔学会発表〕(計 1 件)

子宮内発育不全モデルラットにおける尿細管障害についての検討

村野弥生、東海林宏道、池田奈帆、西崎直人、清水俊明

日本成育新生児学会 2016

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：

ローマ字氏名：

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。