

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19699

研究課題名(和文)胎児期のカルシウム不足は、仔の成獣期に高血圧や慢性腎疾患を引き起こすのか？

研究課題名(英文) Does fetal calcium deficiency cause hypertension and chronic kidney disease in adult pups?

研究代表者

山内 壮作 (YAMAOUCHI, Sohsaku)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：00593500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：Day21において、オス、メスともに実験群はコントロール群と比較して有意に体重が低値であり、Day200のオスで実験群はコントロール群よりも有意に収縮期血圧が上昇していた。腎組織において、Day200のオスにおける実験群はコントロール群よりも糸球体数が少なく、糸球体面積が大きい傾向にある事を確認出来た。

以上から、残存糸球体への過剰ろ過(hyperfiltration)による糸球体内圧の上昇が高血圧の原因であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎児期のカルシウム(Ca)不足は胎児のエピジェネティクスに影響し、仔の低体重と、仔の成獣期における高血圧の発症率を高めるという事が明らかになった。高血圧は慢性腎臓病(CKD)の増悪因子である。胎児期における母体の低Ca状態を予防すれば、CKDの進行により年々増加する新規透析導入患者数(現在の総透析患者数：約33万人)や心血管疾患患者数の減少に大きく貢献できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：On day 21, both male and female rats had significantly lower body weights in the experimental group than the control group, and male rats on Day 200 had significantly higher systolic blood pressure than the control group. Regarding renal tissue, it was confirmed that the experimental group in male rats on day 200 tended to have a smaller number of glomeruli and a larger glomerular area than the control group. Therefore, it was considered that the increase in intraglomerular pressure due to hyperfiltration to the residual glomerulus is the cause of hypertension.

研究分野：小児科(新生児、腎臓)

キーワード：高血圧 エピジェネティクス 子宮内胎児発育遅延 hyperfiltration

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Metabolic syndrome(MS)は、我が国の成人の約1000万人が罹患している生活習慣病で、虚血性心疾患や脳卒中の発症リスクが高くなるため、その予防が重要である。近年、成人でのカルシウム(Ca)摂取不足や glucocorticoid(GC)作用の活性化が MS に関与していることが示唆されている。報告者らも低 Ca 食を投与したラットにおいて、インスリン抵抗性が上昇し GC 活性化変換酵素である 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 の発現が亢進することを報告した(Takaya J, et al. Ann Nutr Metab. 2011)。

胎内での低栄養は、胎児のエピジェネティクスに影響し、成人期の MS をもたらす。胎児期の低栄養状態は、出生時に児の低体重を引き起こす。低出生体重児は、成人期における MS の発症率が高いことが、数多く報告されている。仔の MS 発症が証明された唯一の母獣の低栄養モデルは、低たんぱくだけである。胎内における低たんぱく以外のどのような栄養成分の不足が、MS を引き起こすかは解明されていない。そこで、上記の背景から報告者らは低 Ca 栄養に着目した。

報告者は Ca 欠乏の母ラットから出産した仔ラットは、離乳期において低体重となること、壮年期(生後 100 日)に血清 GC (コルチコステロン)や血清アンジオテンシノーゲンが上昇することを明らかにした(山内 壮作、発達腎研究会誌 2014)。また、報告者は同様の実験系で出生した仔ラットが、中年期(生後 200 日)で肥満を認め、インスリン抵抗性が有意に高まることを報告した(Takaya J, Yamanouchi S, et al. PLoS One. 2014)。これにより、胎児期の低 Ca 状態の是正が、成人期の MS を予防できる可能性が高いことが証明された。

MS だけでなく、Chronic kidney disease(CKD)も本邦の約 1900 万人も罹患している代表的な生活習慣病であり、末期腎不全(現在の総透析患者数: 33 万人)や心血管疾患の発症リスクが上昇するため、その予防は必須である。胎内での低栄養により低体重で出生した児は、成人期に MS だけでなく、高血圧や CKD をもたらすという報告が多数ある。しかし、低たんぱく以外の原因は不明である。また、MS は CKD の発症のリスクを高めるという報告が数多くある。11 β -HSD-2 は GC を不活性化させる酵素であり、母ラットの低たんぱく栄養は、仔ラットの成獣期における 11 β -HSD-2 の発現を低下させ、高血圧や CKD をみちびく事が報告されている。報告者らは、この機序に 11 β -HSD2 遺伝子のエピジェネティクスが関与していることを低マグネシウム栄養で飼育した母ラットを用いて証明した(Takaya J, et al. Epigenetics. 2011)。しかし、胎児期におけるたんぱく以外のどの栄養成分の不足が、高血圧や CKD を誘発するかは解明されていない。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、今まで解明されていなかった成人期に高血圧や CKD を引き起こしうる、低たんぱく以外の胎内の低栄養の原因が、低 Ca 状態であることを明らかにする。「母ラットの妊娠中における Ca 摂取不足が、胎児の GC 関連遺伝子にエピジェネティックな変化(DNA のメチル化)を生じ、仔ラットの成獣期における高血

圧やCKDの発症率を高める」ことを証明する。

3. 研究の方法

本研究では、妊娠中に低Ca栄養状態であった母ラットから出生した仔に関して以下の項目を研究する。

成獣期において高血圧およびCKDが発症していることを明らかにする。

母体の食飼料のCa含量を調節し、低Ca栄養群(実験群)の母体から出生した仔の成獣期(生後200日)における高血圧およびCKD発症(蛋白尿の出現、腎組織の硬化・間質の繊維化等)の有無を確認する。

1) 母ラットの食飼を対照とCa濃度を変えたもので飼育する。

対照群はCa含有率が0.9%、実験群は0.008%となるように、AIN (American Institute of Nutrition)精製飼料基礎配合をもとに調製する(日本クレア社から購入可能)。

以下の図のように飼育し、生後200日で実験をおこなう。

2) 血圧測定を行い、実験群が対照群よりも高血圧であることを明らかにする(血圧測定器は現有)。

3) 代謝ケージ(現有)を用いて採尿をおこなう。

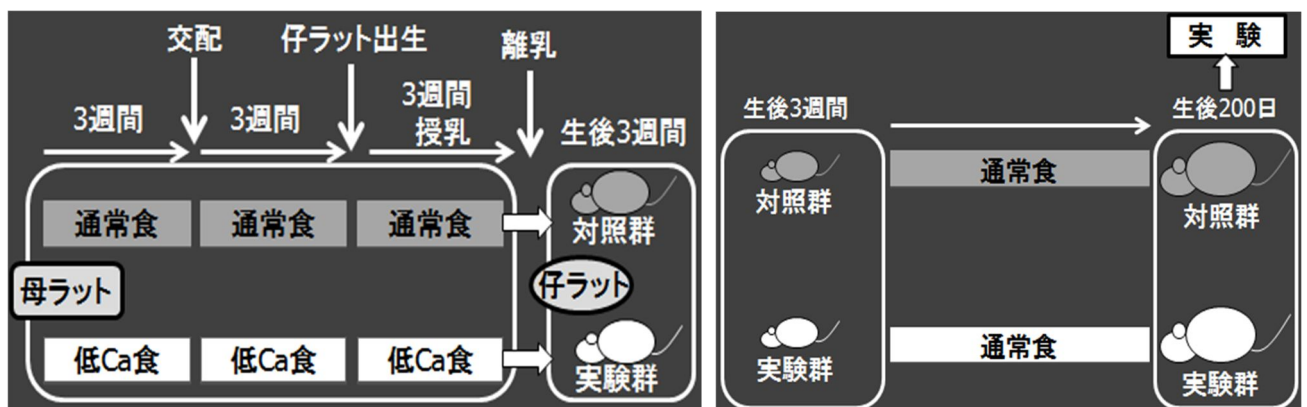
1 仔から採取した尿は、保存し、後日尿中タンパク、クレアチニン(Cr)をELISA法で定量

2 CKDの早期マーカーである尿中のL-FABPやMegalinをELISA法で定量(プレートリーダー現有)

3 クレアチンクリアランス(Ccr) (mL/h/100 g body weight)を測定。

(ラットのCcrの算出方法は、Östreicher I, et al. Nephrol Dial Transplant. 2010を参照する)

実験群が対照群よりも尿中のタンパク、L-FABP、Megalinが高値で、Ccrが低値であることを証明する。



4) 仔を屠殺し、血液と腎組織を採取する。

1 仔から採取した血液は、血清分離後保存し、後日GC(コルチコステロン 図1)やCrをELISA法で測定する(プレートリーダーや-80 のディープフリーザーは現有)。イオン化カチオン測定器(現有)で血漿中のイオン化Caを測定する。実験群のコルチコステロンやCrの上昇を確認する。離乳後から成獣期まで通常食なの

- で、対照群・実験群共に、イオン化Ca濃度に差がないことも確認する。
- 腎組織をホルマリンで保存し、後日、光学顕微鏡(現有)で病理学的変化の解析をおこなう。HE・PAS・PAM・Masson trichrome染色等を行い、実験群において、腎の硬化が出現し、メサンギウム細胞が増殖していることや間質が繊維化していることを明らかにする。また、糸球体数の低下を明らかにし、画像解析ソフト(NIH image 現有)を用いて糸球体の肥大(面積の増加)を証明する。

実験群の母体から出生した仔の成獣期(生後 200 日)において、腎臓の GC に関する解析をおこなう。

- 1) 11 HSD-2 のメチル化の上昇・mRNA の低下、MR のメチル化の上昇・mRNA の低下を証明するために、GC 受容体遺伝子に関わる遺伝子群 (11 β -HSD-2、mineralocorticoid receptor : MR)の DNA メチル化について検討する。なお、MR の mRNA の低下は、血清コルチコステロンの上昇に対するダウンレギュレーションであると報告されている。
 - 1 メチル化DNA免疫沈降に供するDNAを腎から調製する。
 - 2 蛋白発現がDNAメチル化と相関することをウエスタンブローディング法(現有)で確認する。
 - 3 リアルタイムPCR(現有)で、DNAの定量をおこなう。
 - 4 DNA配列中のメチル化部位を特定してメチル化を解析するには、パイロシーケンシング法を用いる。
- 2) 免疫特殊染色にて、実験群の腎組織での 11 HSD-2 の発現の低下を明らかにする。

4 . 研究成果

(1) 結果

上記の方法で述べた実験結果のうち、得られた positive data は以下であった。

Day21 において、オス、メスともに実験群はコントロール群と比較して有意に体重が低値であり、Day200 のオスで実験群はコントロール群よりも有意に収縮期血圧が上昇していた。腎組織において、Day200 のオスにおける実験群はコントロール群よりも糸球体数が少なく、糸球体面積が大きい傾向にある事を確認出来た。

(2) 考察

成獣期のオスで実験群はコントロール群よりも有意に収縮期血圧が上昇していた。腎組織において、成獣期のオスにおける実験群はコントロール群よりも糸球体数が少なく、糸球体面積が大きい傾向にある事を確認出来たことから、残存糸球体への過剰ろ過 (hyperfiltration)による糸球体内圧の上昇が高血圧の原因であると考えられた。

(3) 結論

胎児期の Ca 不足は胎児のエピジェネティクスに影響し、仔の低体重と、仔の成獣期における高血圧の発症率を高めるという事が明らかになった。

(4) 研究成果の学術的・社会的意義

高血圧は慢性腎臓病(CKD)の増悪因子である。胎児期における母体の低 Ca 状態を予防すれば、CKD の進行により年々増加する新規透析導入患者数(現在の総透析患者数：約 33 万人)や心血管疾患患者数の減少に大きく貢献できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----