

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18591225

研究課題名（和文） 子宮内発育不全によるネフロン数減少機序の解明

研究課題名（英文） The mechanism of nephron number reduction induced by intrauterine fetal growth retardation.

研究代表者 飛弾 麻里子(HIDA MARIKO)  
慶應義塾大学・医学部・共同研究員  
研究者番号：20276306

研究成果の概要：本研究は子宮内胎児発育遅滞（IUGR）や低出生体重（LBW）の成人期高血圧発症の原因である腎のネフロン（尿を作る装置）数減少、腎容積の減少の発生機序についての検討である。培養細胞において、IUGR 児で血中濃度が低下するホルモン（レプチン）が、腎発生に必須である細胞内信号伝達因子 MAP キナーゼを介し、細胞の成長・遊走・分化を刺激することが示された。レプチン欠乏が MAP キナーゼを介し IUGR、LBW の腎発生異常に関与する可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	700,000	210,000	910,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	450,000	3,350,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、胎児・新生児医学

キーワード：子宮内発育不全、腎臓発生、oligomeganephronia、レプチン、MAP キナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

1980 年代以降の産科医療、新生児医療の進歩により、低出生体重児が増加、長期生存するようになった。年間出生新生児の 10% が出生体重 2500g 未満の低出生体重児で、そのうち体重 1000g 未満の超低出生体重児の 85% 以上が長期生存する。一方で、低出生体重、子宮内胎児発育遅延（IUGR）が生活習慣病（特に高血圧）発症の危険因

子の一つとして注目されている。高血圧発症機序としてネフロン数減少説が提唱されており、IUGR 動物モデルにおいてもネフロン数の減少、成長後の高血圧が報告されている。またネフロン数減少によると考えられる低出生体重者における腎疾患の発症と重症化のリスクも示唆されている。ネフロン数減少の機序としては、蛋白制限妊娠ラットの胎仔を用いた研究から、後腎

細胞のアポトーシス増加が報告されているが、詳細な機序は解明されていない。

私たちは先天性腎尿路奇形の発症機序の解明に従事してきた。平成 18 年までに、細胞内シグナル伝達分子の MAP キナーゼファミリーが腎成長、ネフロン形成に必須であり、そのカスケードの下流には細胞増殖、分化、アポトーシスに關与する遺伝子が多数存在することを報告した。IUGR 胎児の腎に認められるネフロン減少にも MAP キナーゼが關与している可能性が高いと考えられた。

レプチンは食行動や熱代謝を調節するホルモで、妊娠中は胎盤でも産生され、妊婦の血清レプチン濃度は上昇する。しかし IUGR 症例においては、胎児のレプチン濃度が低くなる。レプチンの受容体は多臓器に存在し、MAP キナーゼを介して細胞増殖や遊走・分化を刺激する。IUGR 胎児において、レプチン欠乏が MAP キナーゼ活性の変化を介して、腎臓の器官形成を抑制している可能性が考えられた。また、早産時の母体に投与されることが多い糖質コルチコイドがレプチンを介して MAP キナーゼに作用する可能性も考えられた。

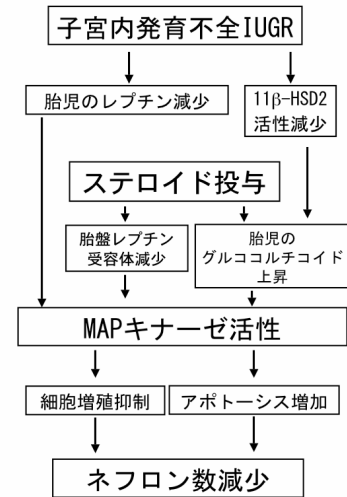
現在、低出生体重児の新生児期治療にかかる多額の医療費が公費でまかなわれており、彼らの成長後の健康維持は、医療経済的にも必要である。低出生体重、IUGR によるネフロン数減少の機序を解明することで、その後の腎機能障害、高血圧の発症予防、治療法の開発につながると考え、本研究を計画した。

## 2 . 研究の目的

IUGR におけるネフロン数減少の機序を解明するため以下の仮説 ( 図 ) を検証する。

(1) IUGR ではレプチン低値のため MAP キナーゼを介したネフロン形成が抑制される。

(2) 糖質コルチコイドは直接かレプチン受容体を介し MAP キナーゼを抑制、ネフロン形成を阻害する。



## 3 . 研究の方法

培養細胞 ( 後腎細胞、尿管芽細胞 ) へのレプチンの影響 ( 増殖、遊走・分化、MAP キナーゼ活性 ) を検討した。

(1) レプチンの細胞増殖、細胞肥大、アポトーシス、遊走、分化への作用を検討

培養後腎間葉細胞 ( 胎生 11.5 日 , H-2Kb-tsA トランスジェニックマウス の後腎間葉から樹立された MS7; vimentin 陽性、cytokeratin、DBA 陰性 ) を用いた。細胞を 24 時間飢餓状態後、レプチン存在下・非存在下で 24 時間培養。レプチンの濃度は予備実験でレプチン刺激による ERK、p38 活性の変化が認められた最小濃度、10 μM にした。

細胞増殖 ( チミジン取り込み )、タンパク量増加 ( ロイシンとりこみ ): 細胞に 3H-チミジンまたは 3H-ロイシンを添加、レプチン存在下・非存在下で 24 時間培養。細胞を融解し、DNA を抽出し、取り込まれた 3H-チミジンまたはロイシンをシンチレーションカウンターで計測。

アポトーシス ( ヘキスト 33258 染色 ): 細胞をレプチン存在下・非存在下で 24 時間培養後、トリプシン処理、細胞浮遊液を作製。ヘキスト 33258 を添加、蛍光顕微鏡で観察す

る。アポトーシス（核の断片化、クロマチンの凝集）細胞を計数した。

遊走（遊走試験）：細胞をコラーゲン処理済みポリカーボネートメンブレン上で培養。レプチン存在下・非存在下で24時間培養後、メンブレン下面に遊走した細胞をギムザ染色し、顕微鏡下で計数。

分化（ウエスタンブロット）：レプチン存在下で培養終了後の細胞から蛋白を抽出し、ウエスタンブロットで尿細管の分化の指標であるEカドヘリンの発現を検討。

(2)レプチンのERKとp38の発現、活性への作用を検討

ウエスタンブロットで活性型MAPキナーゼのExtracellular signal-regulated kinase (ERK)とp38MAPキナーゼ(p38)発現を検討。レプチン存在下・非存在下で培養終了後の細胞から蛋白を抽出し、ウエスタンブロットで活性型ERK(pERK)、活性型p38(pp38)の発現を検討。

(3)ERK阻害薬、p38阻害薬によるレプチンの作用の抑制の有無の検討。

(1)と同様に培養細胞を用い、(1)で行った実験をERK阻害薬MEK阻害薬U0126 5 μM、p38阻害薬SB203580 5 μM存在下で行った。

(4)当初予定していた糖質コルチコイドを用いた実験は有意な結果を得られなかった。

#### 4. 研究成果

(1)レプチン受容体の有無の確認：ウエスタンブロットとimmunocyto-chemistryで、MS7でのレプチン受容体の存在を確認した。

(2)レプチンの後腎間葉細胞肥大作用

レプチン刺激によりチミジン取り込みも細胞数も変化しなかったが、ロイシン取り込みと蛋白/DNA比は有意に増加した。

レプチン刺激により活性化型ERK(P-ERK)、活性化型p38(P-p38)は、それぞれ対照の1.6倍、1.7倍に増加した。ERK、p38蛋白量には

変化がなかった。またレプチンによるロイシン取り込み増加はMEK阻害薬またはp38阻害薬により抑制された。

(3)レプチンの後腎間葉細胞遊走刺激作用

レプチン刺激によりMS7の遊走は対照の約2倍に増加し、この細胞遊走刺激は、MEK阻害薬またはp38阻害薬により抑制された。

(4)レプチンの後腎間葉細胞分化刺激作用

細胞分化を上皮化のマーカであるE-cadherin発現で評価した。ウエスタンブロットで発現量を、免疫細胞化学で発現部位を評価。レプチン刺激により、E-cadherin発現は対照の2.2から3倍に増加した。発現部位は、対照では細胞質に発現を認めたと、レプチン刺激によりE-cadherin発現部位は、細胞質から細胞・細胞間接着部位へ移行した。

(5)本研究の成果から、レプチンはERK、p38を介した後腎間葉細胞肥大と遊走を誘導し、上皮化も促進することが明らかになり、レプチンが正常腎発生およびIUGRにおける腎容積減少に関与する可能性が示唆された。

(6)本研究の結果と意義、関連する研究のなかでの位置づけ、今後の展望

本研究の独自性は、IUGRのネフロン数減少の機序を、ネフロン形成に必須のMAPキナーゼカスケードに着目し検討したことである。正常腎発生、ネフロン形成は多因子の影響を受けており、後腎間葉細胞については、細胞の増殖、アポトーシス、遊走、分化がバランス良く起こる必要がある。IUGRのネフロン数減少のメカニズムについては、間葉細胞のアポトーシスの増加以外には明らかになっていない。本研究から、レプチンがMAPキナーゼの活性化を介して、間葉細胞の肥大・分化・遊走を刺激することが示され、レプチンが腎発生においてMAPキナーゼの上流因子として重要な役割を果たしている可能性が示唆された。本研究の

結果は低出生体重児のネフロン形成抑制の機序解明に貢献すると考えられる。レプチン受容体および MAP キナーゼが多種の細胞に発現していることから、本研究がネフロン形成抑制のみならず、低出生体重児の成長抑制全体の解明にも寄与すると考えられる。今後は、低栄養胎仔から取り出した後腎での器官培養を用いてレプチンの治療的効果の検討を行い、低栄養モデルにおいてネフロン数減少予防の可能性を検討する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 16 件)

1. Efficacy and safety of lisinopril for mild childhood IgA nephropathy: a pilot study. Nakanishi K, Iijima K, Ishikura K, Hataya H, Awazu M et al ; Japanese Pediatric IgA Nephropathy Treatment Study Group. *Pediatr Nephrol.* 2009;24:845-849. 査読あり
2. Tubulointerstitial nephritis and uveitis syndrome: a case with an autoimmune reactivity against retinal and renal antigens. Shimazaki K, Jirawuthi-woravong GV, Nguyen EV, Awazu M, Levinson RD, Gordon LK. *Ocul Immunol Inflamm.* 2008;16(1):51-53. 査読あり
3. Activated extracellular signal-regulated kinase correlates with cyst formation and transforming growth factor-beta expression in fetal obstructive uropathy. Omori S, Kitagawa H, Koike J, Fujita H, Hida M, Pringle KC, Awazu M. *Kidney Int.* 2008 ;73(9):1031-1037. 査読有り
4. Chronic kidney disease に対する angiotensin converting enzyme inhibitor と angiotensin receptor blocker の腎保護作用. 藤田直也, 山田拓司, 上村治, 秋岡祐子, 粟津緑, 他. *日本小児臨床薬理学会雑誌* 21:Page134-137, 2008 査読有り
5. 【小児疾患診療のための病態生理】腎・泌尿器疾患 腎尿路奇形. 粟津緑. *小児内科* 40: Page881-886, 2008 査読無し
6. 腎疾患の病態生理 腎腫大のメカニズム編 異形成腎の腎腫大. 粟津緑. *腎と透析* 65: Page819-823, 2008 査読無し
7. 後腎間葉細胞の増殖、Eカドヘリン発現、MAPキナーゼ活性に対する BMP7 の濃度依存性効果. 粟津緑, 大森さゆ, 長田道夫, 飛弾麻里子. *発達腎研究会誌* 16: Page39-42, 2008 査読あり
8. 【これだけは知っておきたい分子腎臓学 2007】 MAP kinase(ERK). 粟津緑. *腎と透析* 63: Page554-556, 2007 査読なし
9. 【腎・泌尿器疾患診療マニュアル 小児から成人まで】 尿細管機能異常症 nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis. 粟津緑. *日本医師会雑誌* 136 巻特別 2 PageS254-S255, 2007 査読なし
10. 尿細管上皮細胞分化・形質維持における JNK の役割. 藤田尚代(平塚共済病院 小児科), 大森さゆ, 飛弾麻里子, 粟津緑. *発達腎研究会誌* 15:Page8-13, 2007 査読有り
11. Steroid treatment for severe childhood IgA nephropathy: a randomized, controlled trial. Yoshikawa N, Honda M, Iijima K, Awazu M et al.; Japanese Pediatric IgA Nephropathy Treatment Study Group. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006;1(3):511-517. 査読あり
12. Hyponatremia, hypophosphatemia, and hypouricemia in a girl with macrophage activation syndrome. Yamazawa K, Kodo K,

Maeda J, Omori S, Hida M, Mori T, Awazu M. Pediatrics. 2006, 118:2557-2560. 査読あり

13. Extracellular signal-regulated kinase inhibition slows disease progression in mice with polycystic kidney disease. Omori S, Hida M, Fujita H, Takahashi H, Tanimura S, Kohno M, Awazu M. J Am Soc Nephrol. 2006 17(6):1604-1614. 査読あり

14. ERK 阻害によるマウス多発性嚢胞腎進展抑制. 栗津緑, 藤田尚代, 飛弾麻里子 他. 発達腎研究会誌 14: Page49-53, 2006 査読あり

15. 腎発生における MAP キナーゼ. 栗津緑. 日本小児科学会雑誌 110: Page647-655, 2006 査読有り

16. 【超低出生体重児の生存限界と成育限界】 長期予後からみた成育限界 血圧, 腎機能から. 栗津緑, 飛弾麻里子. 小児科 46: Page2113-2121, 2006 査読無し

[学会発表](計 24 件)

1. Hida M, Awazu M. Leptin Induces Migration Via ERK and p38 in a Metanephric Mesenchymal Cell Line. The American Society of Nephrology Renal Week 2008. Nov 6, 2008. Philadelphia, USA.

2. Awazu M, Hida M. Maternal Nutrient Restriction Activates Developmentally Regulated Signaling Pathways in Fetal Rat Kidney. The American Society of Nephrology Renal Week 2008. Nov 6, 2008. Philadelphia, USA.

3. 飛弾麻里子 他. 学校検尿で蛋白尿を指摘され、軽度腎機能低下を確認した超低出生体重児二症例. 第53回日本未熟児新生児学会. 2008.10.30-11.1. 札幌.

4. Hida M, Omori S, Nagata M, Awazu M. Leptin induces migration and epithelialization in a metanephric mesenchymal cell line. 第43回日本小児腎臓病学会学術集会. 2008.6.13-14. 福岡

5. 栗津緑, 飛弾麻里子. マイクロアレイを用いた母体低栄養ラット胎仔腎における遺伝子発現解析. 第43回日本小児腎臓病学会学術集会. 2008.6.13-14. 福岡

6. 栗津緑. 腎発生におけるMAPキナーゼ 研究を通してわかった発達腎臓学の魅力. 第43回日本小児腎臓病学会学術集会. 2008.6.13-14. 福岡

7. 栗津緑, 飛弾麻里子. マイクロアレイを用いた母体低栄養ラット胎仔腎における遺伝子発現解析. 第51回日本腎臓学会学術集会. 2008.5.30-6.1. 福岡

8. Hida M, Awazu M. Effect of maternal dexamethasone treatment on fetal kidney gene expression. The American Society of Nephrology Renal Week 2007. Nov 2, 2007. San Francisco, USA.

9. Awazu M, Hida M. Effect of maternal nutrient restriction on fetal kidney gene expression. The American Society of Nephrology Renal Week 2007. Nov 2, 2007. San Francisco, USA.

10. Hida M, Awazu M et al. Leptin induces hypertrophy of metanephric mesenchymal cells via mitogen-activated protein kinases, 14<sup>th</sup> Congress of the International Pediatric Nephrology Association. Sep 2, 2007. Budapest, Hungary.

11. Awazu M, Hida M. Dose-dependent effects of BMP7 on proliferation, E-cadherin expression, and MAP kinase activation

n in a metanephric mesenchymal cell line. 14<sup>th</sup> Congress of the International Pediatric Nephrology Association. Sep 2, 2007. Budapest, Hungary.

12. 森治郎、飛弾麻里子 他. 極低出生体重児の腎機能に関する検討 尿検査のみで尿細管機能評価は可能か? 第42回日本小児腎臓病学会学術集会. 2007.6.28-30. 横浜

13. 栗津緑、飛弾麻里子 他. 後腎間葉細胞の増殖、Eカドヘリン発現、MAPキナーゼ活性に対するBMP7の濃度依存性効果. 第42回日本小児腎臓病学会学術集会. 2007.6.28-30. 横浜

14. 藤田尚代、栗津緑. 小児急性腎不全の鑑別におけるFEUNの有用性. 第42回日本小児腎臓病学会学術集会. 2007.6.28-30. 横浜

15. 飛弾麻里子、栗津緑 他. レプチンのMAPキナーゼを介する後腎間葉細胞肥大作用. 第42回日本小児腎臓病学会学術集会. 2007.6.28-30. 横浜

16. 飛弾麻里子、栗津緑. レプチンのMAPキナーゼを介する後腎間葉細胞肥大作用. 第50回日本腎臓学会学術総会. 2007.5.26. 浜松

17. Hida, M.Awazu M et al. Leptin induces hypertrophy *via* mitogen-activated protein kinase pathways in a metanephric mesenchymal cell line. The American Society of Nephrology Renal Week 2006. Nov 6, 2006. San Diego, USA

18. Awazu M, Hida M. Dose-dependent effects of BMP7 on proliferation, E-cadherin expression, and MAP kinase activation in a metanephric mesenchymal cell line. The American Society of Nephrology Renal Week 2006. Nov 6, 2006.

San Diego, USA

19. 大森さゆ、栗津緑、北川博昭、小池淳樹、藤田尚代、飛弾麻里子. 胎生期シャントによるERK活性化、TGF- $\beta$ 発現の抑制 ヒツジ胎仔尿路閉塞モデルにおける検討. 第41回日本小児腎臓病学会学術集会. 2006.6.22-24, 名古屋

20. 栗津緑、高橋久英、飛弾麻里子、他. 経口MEK阻害剤によるマウス多発性嚢胞腎進展抑制. 第41回日本小児腎臓病学会学術集会. 2006.6.22-24, 名古屋

21. 藤田尚代、大森さゆ、飛弾麻里子、栗津緑. 尿管上皮細胞分化・形質維持におけるJNKの役割. 第41回日本小児腎臓病学会学術集会. 2006.6.22-24, 名古屋

22. 大森さゆ、藤田尚代、飛弾麻里子、栗津緑. ヒツジ胎仔尿路閉塞モデルにおける胎生期シャントのERK活性化、TGF- $\beta$ 発現への影響. 第49回日本腎臓学会学術総会. 2006.6.14-16, 東京

23. 藤田尚代、大森さゆ、飛弾麻里子、栗津緑. 尿管上皮細胞分化・形質維持におけるJNKの役割. 第49回日本腎臓学会学術総会. 2006.6.14-16, 東京

24. 栗津緑、飛弾麻里子 他. 経口MEK阻害剤によるマウス多発性嚢胞腎進展抑制. 第49回日本腎臓学会学術総会. 2006.6.14-16, 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

飛弾 麻里子 (HIDA MARIKO)  
慶應義塾大学・医学部・共同研究員  
研究者番号: 20276306

### (2) 研究分担者

栗津 緑 (AWAZU MIDORI)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号: 20129315

### (3) 連携研究者

該当者なし