

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07831

研究課題名(和文)胎児期低栄養による腎障害および高血圧発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms underlying renal injury and hypertension in adult period caused by abnormalities of tissue stem cell memory by malnutrition in fetal period.

研究代表者

高橋 昌里 (TAKAHASHI, Shouri)

日本大学・医学部・客員教授

研究者番号：60328755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胎児期低栄養による生活習慣病発症は、組織幹細胞や前駆細胞のエピジェネティック情報の異常が、成人期にその修復機能低下を来すことよると仮説を立てた。妊娠期低栄養ラットを作成し、出生児の血圧、組織修復細胞や前駆細胞の機能評価、腎臓由来間葉系幹細胞(MSC)の特徴、エピジェネティック情報を評価した。結果、腎臓由来MSCはオープンクロマチン領域の変化に基づき、間葉細胞により分化し、レニンアンジオテンシン系の亢進により成獣期の高血圧に関与している可能性が考えられた。さらに組織修復細胞、前駆細胞の機能低下が成獣期の腎障害や血管障害の一因になっていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年我が国では低出生体重児の出生頻度が増加している。また胎児期低栄養の子宮内環境が成人期の生活習慣病の素因となることが広く知られているが、そのメカニズムは不明な点が多い。今回、組織幹細胞や前駆細胞のエピジェネティック情報と、成人期の組織修復細胞の修復機能との関連を示したことは、国民病である生活習慣病の予防の一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that the onset of lifestyle-related diseases caused by fetal undernutrition is due to abnormalities in epigenetic information of tissue stem cells and progenitor cells, which induce impairment of their repair ability for organ dysfunction in adulthood. We generated gestational-period hypotrophic rats and monitored changes in blood pressure, and investigated the function of label-retaining cells (LRCs) and vascular endothelial progenitor cells (EPCs). We also evaluated characteristics of kidney-derived mesenchymal stem cells (MSCs), and their epigenetic alterations. Kidney-derived MSCs from fetal undernutrition rats showed undifferentiation to mesenchymal cells with epigenetic abnormalities, which induces hypertension in adult animals with increasing the renal renin-angiotensin system. Furthermore, the decreased tissue repair function of LRCs and EPCs from fetal undernutrition rats may contribute to the renal and vascular damage in adulthood.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：胎児期低栄養 間葉系幹細胞 血管内皮前駆細胞 Label-retaining cell エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

近年我が国では平均出生体重が減少し、低出生体重児の出生頻度が増加しており、母親の妊娠期の栄養不足が原因とされている。

また、胎児期低栄養の子宮内環境で生活習慣病要因が形成され、負の生活習慣が負荷されることで生活習慣病が発症すると言う「胎児プログラミング仮説」が唱えられている。

一方、妊娠中低栄養で特に胎児の発達で必須栄養素の一つであるタウリン不足は胎児期低栄養による生活習慣病発症に関わっていることも知られている。

ところで最近、最終分化した臓器の組織幹細胞 (MSC) は、一度その臓器に傷害が起きると、細胞分裂を繰り返して臓器形成と同じように傷害臓器を修復する修復細胞として働いていることが知られてきた。そしてこれら幹細胞は記憶 (エピジェネティック情報) を持っている事が報告された。

さらに腎尿細管に幹細胞性を持つ Label-retaining cells (LRC) の存在が報告され、ラットの虚血再灌流障害の急性腎不全モデルにおいて、尿細管再生過程で増殖細胞の供給源として機能し腎障害の修復細胞として働く前駆細胞であることが明らかになった。

また、血管内皮前駆細胞 (EPC) は血管新生に関わっており、EPC は高血圧症、糖尿病などの酸化ストレス病態において傷害された血管を修復している修復細胞と考えられ、EPC 機能が低下すると修復が不十分で血管障害が確立すると考えられた。

そこで、胎生期に低栄養で臓器形成を余儀なくされた幹細胞や前駆細胞はその状態を記憶しており、この異常が成人期の生活習慣病発症に関わっているのではないかという着想に至り、今回の研究を開始した。

2. 研究の目的

胎児期低栄養による生活習慣病発症の機序は、出生児の幹細胞や前駆細胞のエピジェネティック情報の異常により、成人期に腎臓由来 MSC の変化や LRC および EPC 機能低下から、慢性腎臓病や高血圧などの生活習慣病が発症するという仮説を立て、胎児期低栄養による腎障害および高血圧発症の新しい機序を解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 8週齢のメス Wistar ラットを、正常食母胎群 (C 群) と胎児期低栄養として低蛋白食母胎群 (LP 群) に分けた。C 群には通常食、通常飲水を与えた。低蛋白食群はさらに LP 群とタウリン補充を行った低蛋白食 + タウリン補充母胎群 (LPT 群) に分け、両群とも 8 週齢から蛋白質含有量を 8% にした低蛋白食を与え、LP 群には通常飲水、LPT 群には 3% タウリン水を与えた。各群の産仔ラットは生後 21 日目に離乳し、離乳後は通常食・通常飲水を与えた。60 週齢まで観察し、2 週に一度体重測定と tail-cuff 法にて血圧測定を行った。

(2) 11 週齢の各群産仔ラットに、Bromodeoxyuridine、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を 1 週間腹腔投与し、その 2 週間後に右腎を摘出した後、左腎に 45 分間左腎動脈のクリッピングにて虚血操作を行い、24 時間後に左腎切除し、蛍光免疫染色を行い BrdU 陽性細胞にて LRC の検出を行った。

(3) EPC 機能評価を 60 週齢において各群産仔ラット下大静脈から全血採血し、単核球を分離、培養し行った。

(4) 腎臓由来 MSC の単離・培養・確認を行った。C 群、LP 群の 14 週齢の産仔ラットの腎臓から、CD44 陽性細胞を単離し培養を継続した。この細胞に、CD34、CD44、CD45、CD90 抗体を用いてフローサイトメトリーを行い、腎臓由来 MSC を確認した。腎臓由来 MSC に対して、Transforming growth factor-1 (TGF-1) を 0、6、12、18 日間インキュベートし、細胞から蛋白を抽出し、ウエスタンブロット分析にて、それぞれの群の各日数にて h-caldesmon、 α -smooth muscle actin (SMA)、Liver X receptor alpha (LXR- α)、Renin について定量的に評価した。さらに腎臓由来 MSC のオープンクロマチン領域の解析として Assay for Transposase-Accessible Chromatin シーケンシング解析 (ATAC-seq) でシグナルが増加、活性化された領域の特定を行った。そのうち 2 群間で活性化のピークの差が大きく、特に転写制御領域とその標的遺伝子の距離が近い領域の遺伝子を抽出した。さらに RNA シーケンシング解析 (RNA-seq) で 2 群それぞれの腎臓由来 MSC の各遺伝子の発現変動を定量的に評価し、2 群間の発現変動を比較した。その結果 2 群間のオープンクロマチン領域の差異に寄与している可能性のある遺伝子を同定した。

4. 研究成果

(1) LP 群の産仔ラットは、出生後より一貫して低体重で推移し、血圧は 44 週齢（成人期）以降に有意な上昇を認めた。またタウリン負荷はそれらの変化を予防した（図 1）。

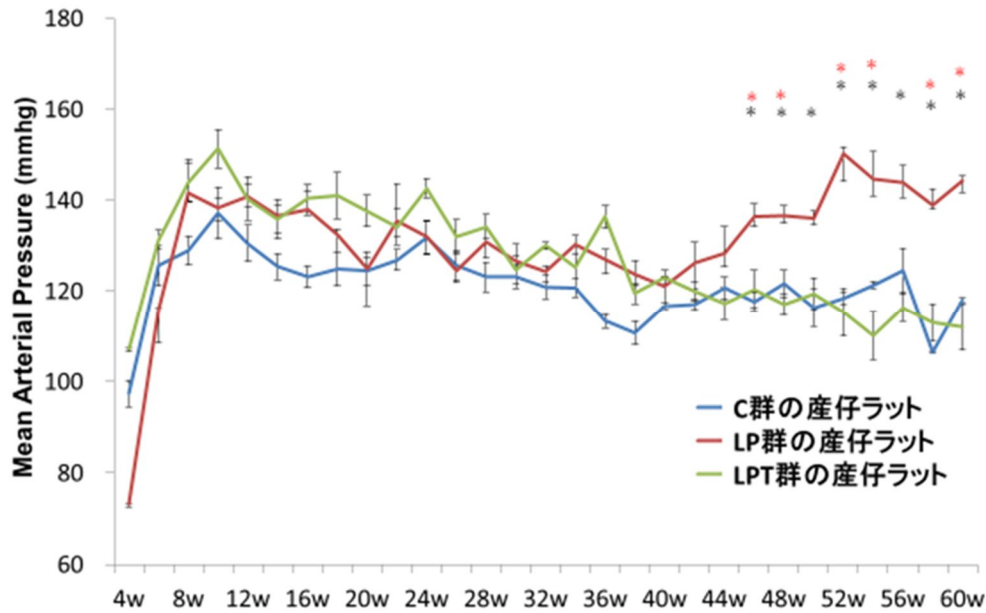


図 1 各群産仔ラットの血圧の推移

(2) 腎髄質の虚血再灌流腎の LRC の発現を BrdU 陽性細胞のラベリングした。虚血再灌流腎の BrdU 陽性の LRC は各群の産仔ラットとも遠位&近位尿細管の核に局在していた。各群 N=3 でそれぞれ 200 倍下 5 視野の計 15 視野の BrdU 陽性細胞数をカウントし比較した。C 群と比較して LP 群、LPT 群の産仔ラットでは有意に陽性細胞数は低下していた。LPT 群では LP 群の産仔ラットに比しやや増加していたが、有意差はなかった。（図 2）。つまり母胎の低蛋白食により産仔ラットの尿細管の修復細胞数の低下を認め、母胎のタウリン補填でも明かな是正効果は認めなかった。

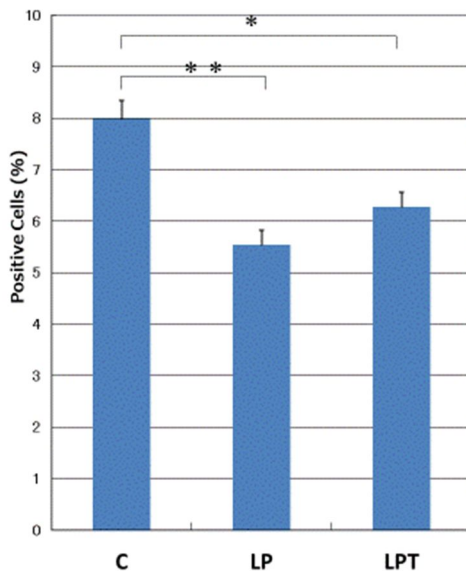


図 2 14 週齢の各群産仔ラットの虚血再灌流腎の BrdU 陽性細胞の免疫染色

(3) 末梢血からの EPC のコロニー数を比較することで EPC の機能評価を行った。LP 群の産仔ラットは C 群および LPT 群の産仔ラットと比較し有意な EPC コロニー数の減少、つまり EPC 機能低下を認めた。C 群および LPT 群の産仔ラットを比較すると有意差はなかった（図 3）。低蛋白食母胎にタウリンを補填することで、産仔ラットにおける EPC 機能は通常食の母胎と同程度まで改善させることがわかった。

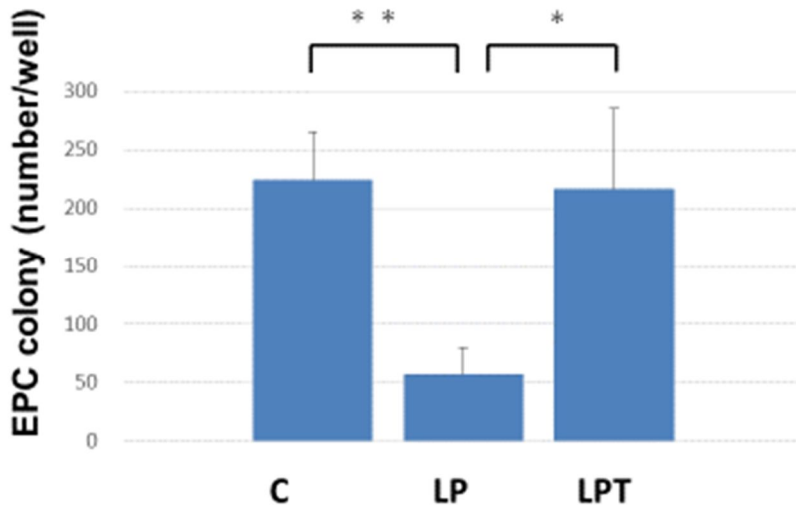


図3 各群産仔ラットの血管内皮前駆細胞（EPC）コロニー数

(4) LP群の産仔ラットの腎臓由来間MSCでは、C群の産仔ラットの腎臓由来MSCと比較してh-caldesmon、SMAが高発現し、より間葉細胞に分化していることが示された。また転写因子LXR- α の発現も高く、これによりレニンの発現も高かった(図4)。腎臓MSCオープンクロマチン領域の解析では、C群の産仔ラットのMSCと比較してLP群の産仔ラットのMSCで、Protease activated receptor 2、Chac1、Tspan6の3つの遺伝子の発現亢進が見いだされた。

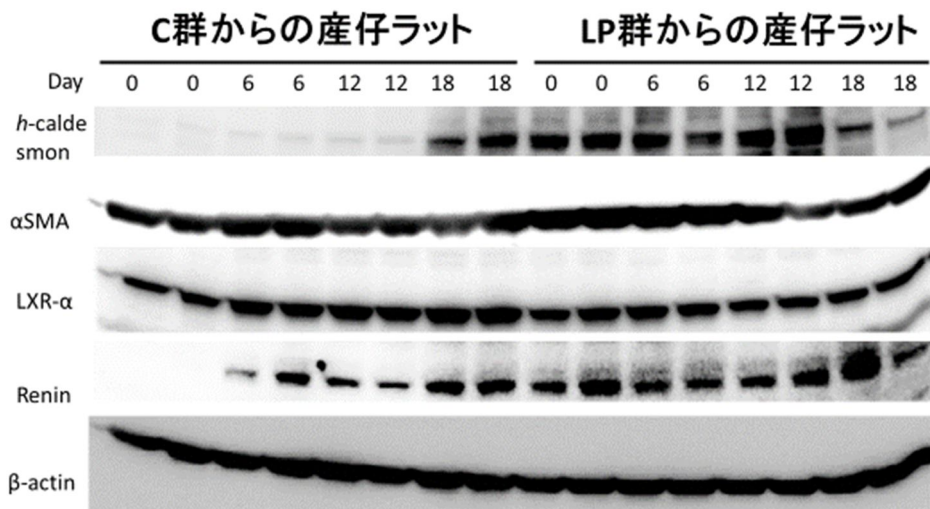


図4 腎臓由来間葉系幹細胞（MSC）のTGF- β 1によるメサンジウム細胞への分化

これまでの検討により、胎児期低栄養では、産仔で出生児から継続する体重低下を起こした。成獣期には高血圧を発症したが、タウリン投与により予防できた。これらの病態にはLRC機能異常での腎臓修復異常による腎障害、EPC機能異常による血管障害が関与することが示唆された。また産仔ラットの腎臓由来MSCは既に間葉細胞により分化していたことより、腎内のレニンアンジオテンシン系の亢進が成獣期の高血圧に関与している可能性が示唆された。また今後の課題として、本研究におけるエピゲネティクスの解析は順遺伝学的手法に基づくものであり、これらの遺伝子が単一で表現型の違いに関与しているかどうかは、細胞レベル、可能であれば個体レベルでノックインあるいは、ノックアウトモデルを作成し精査する必要がある。

<引用文献>

Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*. 1986;1(8489):1077-81.

Tang C, Marchand K, Lam L, Lux-Lantos V, Thyssen SM, Guo J, et al. Maternal taurine supplementation in rats partially prevents the adverse effects of early-life protein deprivation on beta-cell function and insulin sensitivity. *Reproduction*.

2013;145(6):609-20.

Yang C, Tibbitt MW, Basta L, Anseth KS. Mechanical memory and dosing influence stem cell fate. *Nat Mater.* 2014;13(6):645-52.

Maeshima A. Label-retaining cells in the kidney: origin of regenerating cells after renal ischemia. *Clin Exp Nephrol.* 2007;11(4):269-74.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水翔一、福田 昇、片川まゆみ、Chen Lan、深澤みゆき、金田篤志、諸橋 環、阿部雅紀、森岡一朗.
2. 発表標題 胎児期低栄養での幹細胞異常による成人期腎障害および高血圧発症機序の検討
3. 学会等名 第54回 日本小児腎臓学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水翔一、福田 昇、片川まゆみ、Chen Lan、深澤みゆき、金田篤志、諸橋 環、阿部雅紀、森岡一朗
2. 発表標題 胎児期低栄養での幹細胞異常による成人期腎障害および高血圧発症機序の検討
3. 学会等名 第62回 日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水翔一、福田 昇、片川まゆみ、Chen Lan、深澤みゆき、阿部雅紀、金田篤志、諸橋 環、高橋昌里、森岡一朗
2. 発表標題 胎児期低栄養での幹細胞メモリー異常による高血圧発症メカニズム
3. 学会等名 第42回 日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片川まゆみ、福田 昇、清水翔一、阿部雅紀、高橋昌里、松本太郎
2. 発表標題 胎児期低栄養における組織幹細胞と成熟期血圧へのタウリン摂取の効果の検討
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水翔一、福田 昇、片川まゆみ、深澤みゆき、諸橋 環、高橋昌里、金田篤志、阿部雅紀、森岡一朗
2. 発表標題 胎児期低栄養での幹細胞メモリー異常による腎障害および高血圧発症メカニズム
3. 学会等名 第22回日本循環薬理学会 第55回高血圧関連疾患モデル学会 合同学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片川まゆみ、福田 昇、清水翔一、常見明子、高橋昌里、阿部雅紀
2. 発表標題 胎児期低栄養における組織幹細胞と成熟期血圧へのタウリン摂取の効果の検討
3. 学会等名 第22回日本循環薬理学会 第55回高血圧関連疾患モデル学会 合同学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水翔一、福田 昇、片川まゆみ、Lan Chen、深澤みゆき、金田篤志、諸橋 環、阿部雅紀、森岡一朗
2. 発表標題 胎児期低栄養での組織幹細胞の異常による成人期腎障害及び高血圧発症の可能性の検討
3. 学会等名 第54回高血圧関連疾患モデル学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimizu S, Fukuda N, Chen L, Katakawa M, Fukazawa M, Abe M, Morioka I
2. 発表標題 Mechanisms underlying renal injury and hypertension in adult period caused by abnormalities of tissue stem cell memory by malnutrition in fetal period.
3. 学会等名 第8回IRGミーティング
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水翔一、福田 昇、片川まゆみ、Lan Chen、深澤みゆき、阿部雅紀、金田篤志、諸橋環、高橋昌里、森岡一朗
2. 発表標題 胎児期低栄養による腎臓組織幹細胞のエピジェネティクスに異常による高血圧発症メカニズム
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水翔一、福田 昇、片川まゆみ、Chen Lan、深澤みゆき、阿部雅紀、金田篤志、諸橋環、高橋昌里、森岡一朗
2. 発表標題 胎児期低栄養による幹細胞メモリー異常による成人病発症機序の解明
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水翔一、福田 昇、片川まゆみ、深澤みゆき、阿部雅紀、諸橋 環、高橋昌里、森岡一朗
2. 発表標題 胎児期低栄養による幹細胞メモリー異常による成人病発症機序の解明
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

〔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
研究 分担 者	金田 篤志 (KANEDA Atsushi) (10313024)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	福田 昇 (FUKUDA Noboru) (40267050)	日本大学・医学部・教授 (32665)	
研究分担者	諸橋 環 (MOROHASHI Tamaki) (60781416)	日本大学・医学部・助教 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関