

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591420

研究課題名（和文）

胎内プログラミングによる腎発育異常における mTOR 経路の役割

研究課題名（英文）

The role of mTOR pathway in kidney development disorder induced by fetal programming.

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（和文）：本研究では胎内プログラミングによる腎発育異常における mTOR (The mammalian target of rapamycin) 経路の役割の解明する。母体低栄養、ステロイド投与によりラット胎児の新生児早期後腎は大きさ、糸球体の数共に有意に減少した。これら後腎の遺伝子および蛋白発現の網羅的解析で、mTOR 経路を含む多くの遺伝子・蛋白の発現の変化を確認し、免疫組織染色、ウエスタンブロットでも mTOR 経路の抑制を確認した。現在関連遺伝子のメチル化解析中であり、mTOR 経路抑制から腎発生異常に至る機序の詳細はまだ検討中である。

研究成果の概要（英文）：The main purpose of this study is to elucidate the role of mTOR (The mammalian target of rapamycin) in developmental disorder of kidney induced by fetal programming. Maternal nutrient restriction (NR) or dexamethasone treatment (DEX) led to significant growth restriction and reduction of nephron number in fetal metanephros. Micro array of these metanephros revealed the NR and DEX had led to change in expression pattern of a large number of genes and proteins including mTOR pathways. Immunoblot and immunohistochemistry of metanephros, mTOR pathway was downregulated by NR and DEX. We are now analyzing the methylation pattern of some of the genes which expression alteration was detected in the micro array analysis. In conclusion, we have identified downregulation of mTOR pathway by NR or DEX, but the precise mechanism to be elucidated which may be important in the pathogenesis of fetal programming in kidney development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医師薬学

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：(1)胎児医学(2) autophagy(3) エピジェネティクス(4) oligonephronia (5)子宮内発育遅滞(6)ステロイド(7)低栄養(8)成人病胎児期発症説(Barker 仮説)

1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は胎内プログラミングによる腎発育異常における mTOR (The mammalian target of rapamycin) 経路の役割を解明することである。

プログラミングとは胎児期、周産期のイベントへの適応が成長後も持続し種々の影響を及ぼすことである。Barker 仮説以降、生活習慣病の起源は器官発生前にあり、早産、低出生体重、子宮内発育遅延 (IUGR)、母体への薬物投与が生活習慣病発症の危険因子の一つとして提示されている。本邦における、新生児の出生体重および在胎週数の低下は著しく、2004 年の母子保健事業団の統計では、年間出生数が 1980 年の 157.7 万から 111.1 万へと減少しているにもかかわらず、在胎 37 週未満の早産児は 4.1 5.7% へ、出生体重 2500g 未満の低出生体重児も 5.2 8.8% へと増加、特に未熟性の強い在胎 32 週未満、出生体重 1500g 未満の児の割合が増加している。体重 1000g 未満の超低出生体重児でも 85% 以上が長期生存する。現在の新生児医療の目標は後障害の発症予防とともに、成人期の疾患の予防である。

腎に関しては Brenner らが胎内プログラミングによる高血圧発症機序としてネフロン数減少説を提唱し、これを支持するデータが報告されている。ネフロン数減少の機序としては、後腎間葉細胞のアポトーシス増加、ネフロン形成の早期停止が示唆されているが、詳細な機序は解明されていない。ネフロン数減少にはしばしば腎サイズの減少が伴い、尿細管の異常 (線維化、濃縮力低下) も示唆されている。低出生体重が腎機能低下、腎疾患の重症化のリスクになることも報告されている。腎発育異常を生じる実験モデルには母体低栄養、蛋白制限、糖尿病、薬剤投与などがあり、必ずしも IUGR を伴わない。したがって出生体重が正常である児にも腎発育異常が存在する可能性がある。

mTOR はセリン・スレオニンキナーゼで、その上流にある phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) とともに、アミノ酸やグルコースなどの栄養源により活性化され、細胞成長、代謝などを制御する。また mTOR 経路はインスリンなどの成長因子にも制御される。以下の理由から mTOR 経路が胎内プログラミングに重要であると考える。1) 低栄養によって活性が抑制され、細胞 macroautophagy にいたる。Autophagy は 2 型 programmed cell death を伴い、発生過程において重要な役割を果たす。2) レプチンはエネルギーの取り込みと消費の制御に重要な役割を果たすペプチドホルモンであり、IUGR 胎児では血中濃度が低下している。また

レプチンの受容体は腎臓にも存在する。申請者は培養後腎間葉細胞において、レプチンが MAP キナーゼの p38 と ERK を介し、細胞肥大と遊走を刺激することを報告しており、IUGR における腎サイズ減少はレプチン減少による可能性が考えられる。近年、レプチンの mTOR 経路の活性化が報告されており、mTOR 経路も細胞肥大を誘導することから、腎発生におけるレプチンの作用が mTOR を介する可能性が考えられる。3) 申請者は DNA アレイ法により、母体低栄養により影響を受けるラット胎仔後腎遺伝子を検討し、その一つに mTOR の上流酵素、PI3K の catalytic subunit p110a が含まれていた (発現減少)。早産児では肺の成熟を促すために母体へのグルココルチコイド投与が頻繁に行われる。また母体低栄養により母体血中グルココルチコイド濃度が増加することが報告されている。さらに IUGR 胎児において、コルチゾール代謝酵素 11 β hydroxysteroiddehydrogenase (11 β HSD2) の活性が低下し、臍帯血中コルチゾール濃度が増加することが報告されている。動物において母体へのグルココルチコイド投与によりネフロン数が減少することが報告されている。最近その一因として尿管芽分岐数の減少が器官培養により明らかにされた。グルココルチコイドは蛋白合成を阻害すると共に mTOR 経路を抑制する。またステロイドは胎盤のレプチン受容体発現を抑制し、ステロイド合成阻害薬は同発現を亢進することから、ステロイドはレプチン作用抑制により腎発育を抑制する可能性が示唆される。

mTOR の正常腎発生における役割は検討されていない。しかし上流酵素 PI3K/Akt は尿管芽分岐に必須である glial cell derived neurotrophic factor の受容体 Ret の下流に位置し、尿管芽発育を媒介することが報告されている。mTOR 経路の阻害薬には wortmanin、Akt inhibitor、rapamycin がありこの経路の抑制効果を容易に検討することができる。

2. 研究の目的

胎内プログラミングによる腎発育異常における mTOR (The mammalian target of rapamycin) 経路の役割の解明

3. 研究の方法

母体低栄養、デキサメサゾン投与の後腎 mTOR 経路への影響

母体低栄養ラットは妊娠 1 日目より対照の 50% の飼料を与え作成。デキサメサゾン投与

モデルはデキサメサゾン (DEX) 0.2 mg/kg 体重を妊娠 15 日と 16 日に腹腔投与し作成。胎生 18、生後 1、7、14 日の腎溶解液を用い、ウェスタンブロットにより mTOR 経路の分子 (PI3K、Akt、mTOR、4EBP1) の活性型および総蛋白量を評価。ホルマリン固定パラフィン切片を用い、免疫組織染色により胎生 13、15 日の腎も含め、各蛋白の形態学的発現を検討。細胞増殖 (Ki67 染色)、アポトーシス (TUNEL) 評価、mTOR 経路の分子との相関を評価。糸球体数は生後 8 週において Alcian blue 投与により糸球体を染色後サクリファイスし、酸溶解法により計数。

器官培養系におけるアミノ酸欠乏、デキサメサゾンの影響

胎児後腎をデキサメサゾン投与下で器官培養し、腎サイズ (腎面積を顕微鏡写真で計測)、蛋白合成 (ロイシン取り込み)、増殖 (チミジン取り込み)、蛋白/DNA 比、ウェスタンブロット (mTOR 経路分子)、組織 (HE、Ki67 染色、TUNEL 染色、mTOR 経路の分子の免疫染色、分化のマーカー WT1、E カドヘリン) を検討。

培養尿管芽細胞、後腎間葉細胞系におけるアミノ酸欠乏、デキサメサゾンの影響アミノ酸、デキサメサゾン存在下・非存在下で培養し、細胞増殖 (細胞数、チミジン取り込み)、蛋白合成 (ロイシン取り込み)、蛋白/DNA、遊走、凝集、管腔形成 (尿管芽細胞)、分化 (E カドヘリン発現、後腎間葉細胞)、ウェスタンブロット (mTOR 経路分子) を検討。

mTOR 経路の腎発育への影響

器官培養系において mTOR 阻害薬 rapamycin の効果を検討する。検討項目は (1) と同様である。また時間の余裕があれば妊娠ラットに rapamycin を投与し、胎仔腎 生後の腎臓への影響を検討する (糸球体数、尿管芽・間質線維化)。

母体低栄養、デキサメサゾン投与の後腎における autophagy の検討

胎生 13、15、18 日、生後 1、7、14 日の腎における autophagy の有無を電子顕微鏡的にまた Atg8/LC3 のウェスタンブロット、免疫組織染色により検討。

尚、と が実際に行えた。
それぞれの方法の詳細

- a) 器官培養：胎生 14.5 日ラット腎を顕微鏡下で摘出し、アミノ酸、デキサメサゾン存在下、非存在下で培養。培養には Costar 社の Transwell membrane を使用、培地は 10%胎仔ウシアルブミン添加 DMEM 培地を使用。デキサメサゾンの濃度は低濃度 10^{-7} M を用いる。
- b) 細胞増殖 (チミジン取り込み)：細胞に

3H-チミジンを添加培養後、3H-チミジンをシンチレーションカウンターで計測。

- c) アポトーシス (ヘキスト 33258 染色)：細胞を培養後、トリプシン処理、ヘキスト 33258 を添加、蛍光顕微鏡で観察。アポトーシス (核の断片化、クロマチンの凝集) 細胞を計数。
- d) 遊走：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後、メンブレン下面に遊走した細胞を染色・顕微鏡で観察、計数。
- e) 尿管芽細胞の管腔形成：尿管芽細胞をコラーゲン内でデキサメサゾン存在下・非存在下で培養。形態的に管腔形成の有無を検討。
- f) 後腎間葉細胞の凝集 (凝集試験)：デキサメサゾンを添加せずに培養した後腎間葉細胞をトリプシン処理し、細胞浮遊液を作製、24 穴培養容器を用いて細胞浮遊液をデキサメサゾン存在下・非存在下で 1 時間、震盪培養する。セルカウンターを用いて、直径 8 μ m 以上を細胞凝集塊として、凝集塊数を測定。
- g) 腎成長、糸球体形成、尿管芽形成：腎の成長は培養終了後の後腎をデジタルカメラで撮影、NIH image で計測。糸球体形成は蛍光色素結合 peanut agglutinin で染色、計数、評価。尿管芽形成は蛍光色素結合 Dorichosbiflorus agglutinin で染色。分枝点数、分枝点間の長さおよび幅、分枝点における分枝角度、尿管芽先端数の計数、計測。
- h) 細胞増殖、アポトーシスの評価：培養腎を 2%ホルマリンで固定、TSA Biotin System (パーキンエルマー社) を用い、細胞増殖を抗 Ki-67 抗体で、アポトーシスを TUNEL 法で検出・評価。
- i) 尿管芽細胞、後腎間葉細胞：それぞれ Barasch J (Am J Physiol)、筑波大学病理長田道夫教授により供与。

4. 研究成果

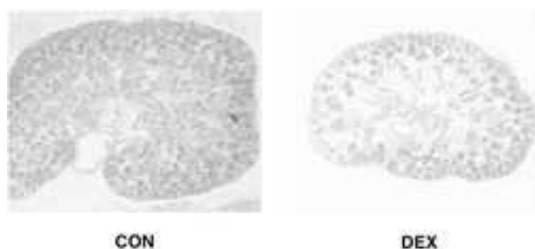
母体低栄養、デキサメサゾン投与の後腎への影響

In vivo で母体低栄養、デキサメサゾン (DEX) 投与により後腎が受ける影響を検討した。母胎に栄養制限 (NR) またはデキサメサゾン投与を行った胎児の新生児後腎は大きさ、糸球体の数共に有意に減少した (表 1、図 1)。

(表 1) Fetal weight and metanephros size
CON, control; NR, maternal nutrient restriction. *P<0.05.

		Fetal Weight (g)	Metanephros size (%)
E13	CON	0.087 ± 0.003(11)	100 ± 6 (6)
E13	NR	0.086 ± 0.004(12)	97 ± 10 (6)
E14	CON	0.202 ± 0.003(14)	100 ± 6 (8)
E14	NR	0.187 ± 0.003*(14)	57 ± 5* (6)
E15	CON	0.32 ± 0.01 (15)	100 ± 6 (15)
E15	NR	0.26 ± 0.01* (12)	80 ± 3* (14)

図 1.



母体低栄養、デキサメサゾン投与による後腎への遺伝子、蛋白発現の変化の網羅的解析

これらの後腎の遺伝子および蛋白の発現を網羅的に解析し、母体低栄養、デキサメサゾン投与による影響を評価した。DEX モデルでは、発生、シグナル伝達、mTOR 経路、細胞増殖、アポトーシス、トランスポーター、イオンチャンネルを含む多くの遺伝子・蛋白の発現が変化することを確認した。この結果から腎の成長・糸球体形成に加え、尿管機能も影響を受けることが示唆された。(表 2) 同様に NR モデルでも mTOR 経路を含む多種の機能の遺伝子、蛋白の発現が影響を受けることを確認した。

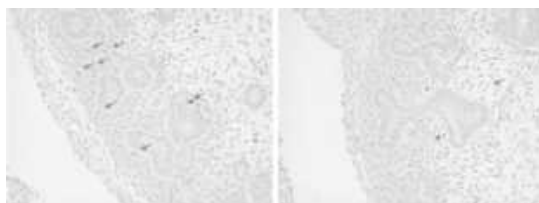
(表 2) Summary of gene expression of biological process in DEX model.

Gene Ontology Category	upregulated		downregulated	
	> 4-fold	2- to 4-fold	> 0.25-fold	0.25- to 0.5- fold
Development	21	21	3	3
Signaling	12	13	12	8
Non-apoptotic cell death	1		2	
Apoptosis		1		
Cell adhesion	6	10		5
Cell growth	1			
Cell proliferation	1			4
Cell migration				1
Transport	2	15	6	12
Metabolism	4	3		1
Regulation of MAPK activity		2		
Cell response to biotic stimuli		9	12	
Morphogenesis		8		
Transcription		4	1	
RNA splicing				1
Circadian rhythm				1
Positive regulation of biological process			7	
Others	89	327	232	121

mTOR 経路、MAP キナーゼ経路を含む腎発生に重要な細胞内信号伝達経路が受ける影響の検討

NR モデル、DEX モデルそれぞれにおいて、後腎の免疫組織染色、ウエスタンブロットを用いて、mTOR 経路、MAP キナーゼ経路のシグナル伝達物質の発現を検討した。

PI3 kinase、Akt、mTOR の活性化型の NR モデルに於ける発現量は対照に比しそれぞれ 0.7 倍、0.5 倍、0.7 倍に低下することを確認した。LAT1 (L-type amino acid transporter 1)、mTOR の活性化に必須の蛋白であるが、もまた E15 で発現が減少していた。しかし発現量は E18 にはそれぞれ 1.3 倍、1.6 倍、1.5 倍、1.4 倍に増加し、その後新生児期には発現量の差は消失した。これは早期の低栄養に対する代償反応が起きている可能性が示唆された。ステロイド投与による mTOR 経路への影響は後腎の免疫組織染色を行い、mTOR 活性が抑制されることを確認した。(図 2)



(図 2) DEX モデルに於ける活性化 mTOR の発現減少 (胎生 15 日、200x) (左)対照 (右) DEX

NR モデル、DEX モデルにおいて、蛋白合成(ロイシン取り込み)、増殖(チミジン取り込み)、蛋白/DNA 比、を検討した。チミジン取り込み、蛋白/DNA 比ともに低栄養モデル、DEX モデルにおいて対照に比し抑制された。腎サイズの減少が細胞数・細胞サイズ両者の減少によることが確認された。(表 3 に NR モデルの結果を示す。)

(表 3)

		DNA/kidney (μg/organ)	protein/DNA (mg/mg)
E15	CON	3.72±0.72 (5)	24.4±4.0 (5)
	NR	3.27±0.29 (5)	22.7±3.0 (5)
E18	CON	19.80±1.68 (10)	28.54±2.3 (10)
	NR	13.94±1.11* (10)	18.04±0.78* (10)

器官培養系におけるアミノ酸欠乏の影響
アミノ酸欠乏下での器官培養系において、尿管芽分枝に与える影響を、尿管芽を DBA により蛍光染色を行い検討した。E15 において NR モデルでは対照に比し有意に分枝が減少し、ネフロン数減少に寄与すると考えられた。(31.0±1.7 vs 59.6±3.5)。デキサメサゾン投与モデルについては現在検討中である。

培養後腎間葉細胞 (MS7) における mTOR 経路抑制の影響
mTOR 抑制が後腎間葉細胞に与える影響を検証するために培養後腎間葉細胞 MS7 を mTOR を rapamycin 存在下で培養し、細胞増殖とアポトーシスについて検討した。10 % FCS(FCS) で刺激された細胞増殖は 0.2 μM rapamycin による mTOR 経路抑制により、減弱した (対照:FCS:FCS+rapamycin は 1459±77: 2394±113:FCS+Rapa 1724±100。一方、rapamycin 添加によりアポトーシスに至った細胞の数においては有意な変化を確認できなかった。

母体低栄養、デキサメサゾン投与の後腎への遺伝子、蛋白発現の網羅的解析で発現変化が確認された遺伝子におけるメチレーション解析

現在解析中であり、まだ結果が出ていない。

以上より母体低栄養、ステロイド投与により mTOR 経路が抑制されることが明らかになった。細胞増殖、細胞成長の抑制、尿管芽の分枝、腎サイズの減少、糸球体数の減少に関与すると考えられた。一方、当初予想した、アポトーシスの増加は確認できなかった。よって腎発生異常に至る機序の詳細についてはまだ検討を継続する予定である。

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 20 件)

粟津 緑. 【クローズアップ腎・泌尿器】概念・研究の進歩 DOHaD と腎障害. 小児内科 44;2011:166-169 査読無し

粟津 緑, 長田 道夫, 飛弾 麻里子. Caspase 3 の尿管芽細胞遊走, cord formation 促進作用, 母体低栄養による尿管芽分枝抑制機序の可能性. 発達腎研究会誌 19; 2011:7-10 査読無し

粟津 緑. 発達腎臓学の見地から考える小児腎不全治療. 日本小児腎不全学会雑誌 31;2011: 41-43 査読無し

Fujita H, Hida M, Kanemoto K, Fukuda K, Nagata M, Awazu M. Cyclic stretch

induces proliferation and TGF-beta1-mediated apoptosis via p38 and ERK in ureteric bud cells. Am J Physiol Renal Physiol. 299(3); 2010:F648-55. 査読有り

粟津 緑, 飛弾 麻里子. 母体低栄養によるラット胎仔腎シグナル伝達系の変化. 発達腎研究会誌 18, 2010:14-17 査読無し

粟津 緑. CAKUT の腎生理. 腎と透析 68, 2010:156-160 査読無し

粟津 緑. Basic Nephrology 母体低栄養がラット胎仔腎の遺伝子発現に及ぼす影響. Annual Review 腎臓 2010, 2010;21-27 査読無し

粟津 緑. 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. 発達腎研究会誌 17, 2009:25-29 査読無し

粟津 緑. 腎における細胞内シグナル伝達と病態生理 糸球体におけるシグナル伝達 糖代謝異常による細胞内シグナル伝達と糖尿病性腎症. 腎と透析 67, 2009:328-331 査読無し

[学会発表](計 15 件)

Awazu M. Maternal Nutrient Restriction Alters Renal Development. The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology, 招待講演, 2011.6.2-4, 福岡

Hida M, Nagata M, Awazu M. Downregulation of mTOR signaling pathway by maternal nutrient restriction in rat metanephros. The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology, 2011.6.2-4, 福岡

飛弾 麻里子, 酒井 智子, 島袋 林秀, 城裕之. 新生児腎機能評価 尿素窒素部分排泄率 (FEUN) の検討. 日本産科新生児医学会学術総会, 2010.7.15, 神戸国際会議場

粟津 緑, 飛弾 麻里子. 母体低栄養によるネフロン数、腎サイズの減少機序. 第 45 回日本小児腎臓病学会, 2010.7.2, 大阪

飛弾 麻里子, 粟津 緑. 母体デキサメサゾン投与ラット胎仔腎の遺伝子発現解析. 日本腎臓学会, 2009.6.3-5, 横浜.

粟津 緑, 飛弾 麻里子. 母体低栄養によるラット胎仔腎シグナル伝達系の変化. 日本腎臓学会. 2009.6.3-5, 横浜.

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（該当無し）

取得状況（該当無し）

〔その他〕

ホームページ等：該当無し

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

粟津 緑（AWAZU MIDORI）

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20129316

(3)連携研究者

該当者なし