

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 22 日現在

機関番号：82506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591222

研究課題名(和文) 低出生体重個体における腎症発症機序の解明：特にミトコンドリアの関与について

研究課題名(英文) Research for investigation of pathogenesis of nephropathy in low-birth-weight individuals

研究代表者

今澤 俊之 (Imasawa, Toshiyuki)

独立行政法人国立病院機構(千葉東病院臨床研究部)・その他部局等・その他

研究者番号：80348276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：研究期間において以下の成果を得た。

1. 低出生体重関連腎症モデルラットの確立, 2. 低出生体重個体ラット腎では腎症発症前からミトコンドリア機能の低下が存在することを主としてプロテオーム解析を用い明らかにした, 3. ヒト糸球体上皮細胞(human podocyte: HP)においてはミトコンドリアネットワークが発達していることを生体内および培養細胞で示した, 4. HP分化段階のエネルギー代謝機構の発達過程とその制御因子を明らかにした, 5. 高血糖下でHPは代謝機構を変化させ、解糖系に依存すること、そしてその機序を解明した

研究成果の概要(英文)：The main results are;

1.Establishment of rat model of low-birth-weight related nephropathy, which resembles human low-birth-weight related nephropathy; 2.Elucidation of decreased mitochondrial function, for examples decreased OXPHOS complex subunits and decreased enzymes of TCA cycle, in kidneys in low-birth-weight rats mainly by proteome analysis; 3.Elucidation of well-developed mitochondrial networks in human podocytes (HPs) in vivo and in vitro; 4.Elucidation of processes and mechanism how HP develop their energy metabolic systems; 5.Elucidation of HPs change their energy metabolic system to glycolysis-dependent way in high glucose by using human podocyte cell line

研究分野：腎臓内科

キーワード：ミトコンドリア 巣状分節状糸球体硬化症 低出生体重 糖尿病性腎症 エネルギー代謝 糸球体上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、低出生体重児において成人期に高血圧、糖尿病、高尿酸血症の発症率が高いことが報告されています。腎においては、低出生体重個体におけるネフロン数は少なく (Hughson M, *Kidney Int* 2003) そのため低出生体重個体では成長に伴うネフロンへの負荷増大から腎機能障害へと繋がる (Vikse BE, *J Am Soc Nephrol* 2008) ことは「hyperfiltration theory」にて説明可能であるように思われます。しかし、血行動態学的には説明が完結しているようですが、最終的な腎障害機序が明らかになっているとは言えず、実際にその治療法も未だ回答が得られていません。

低出生体重動物モデルでもネフロン数が少なく (Wloddek ME, *Kidney Int* 2008)、そのような状態に何らかの腎症誘発手技 (尿管結紮、虚血再灌流、糖尿病惹起) を加えた場合、正常個体より重症化し、そこには低出生体重個体での酸化ストレス過多が関わっていると報告されています (Ojeda NB, *Am J Physiol Renal Physiol* 2011)。しかし、ヒト低出生体重個体での糸球体病変は巢状分節状糸球体硬化症 (FSGS) であるにも関わらず、これまで低出生体重個体 FSGS 動物モデルは作成されておらず、病態を理解する上で適切なモデルはまだ存在しません。

一方、ヒト低出生体重での糸球体所見は FSGS で、最近当院でも 4 例の低体重出生 FSGS 症例を経験しました。更に、この全例において異常 Mit が集積した granular swollen epithelia cells (GSECs) を遠位尿管・集合管に認めました。GSECs はこれまで Mit 脳筋症においてのみ、その存在が報告されました (Kobayashi A, *Am J Surg Pathol*. 2010)。Mit 脳筋症の代表的糸球体病変は FSGS であり、Mit 脳筋症と低出生体重関連腎症においては糸球体のみならず尿管にも同様の病理所見が見られることは、両者の腎症発症機序の相同性を示唆すると考えました。これらのことから、Mit 脳筋症では先天的 Mit 遺伝子異常から Mit 機能が低下するのに対し、低出生体重個体では後天的機序で Mit 機能不全がおこり腎症が形成されるという新規の仮説を立てました。

2. 研究の目的

以下を当初主要な目的とした

- ヒト低出生体重関連腎症類似病変を有する低出生体重動物 (ラット) モデル確立
- 低出生体重個体腎と正常出生体重個体腎の組織学的比較
- 低出生体重個体腎における Mit 機能についての解析

更に研究は期間内に得た成果により、次の段階へ進むべく以下の目的を追加した。

- ヒト糸球体上皮細胞におけるエネルギー代謝機構の解明と病的状態下 (ここでは高血糖下) でのエネルギー代謝の変化

について明らかにする

ヒトの低出生体重関連 FSGS 症例を含む FSGS 症例のミトコンドリア遺伝子解析を含む詳細な検討 (倫理委員会承認あり)

3. 研究の方法

ラット妊娠 15 日と 16 日に、dexamethazone (DEXA) を 0.2mg/kg で腹腔内投与することで低体重出生のラットを得、4 週齢となったところで片側腎臓摘出術を行いネフロンへの過負荷の状況を作り出し、更に高塩食により飼育を行い、9 週時で解析を行った。

上記ラットの 4 週時摘出腎と 9 週時での腎組織について組織学的な比較を行った。さらに 4 週時の摘出腎を用いて網羅的な定量的プロテオミクスを実施した。

上記ラットの 4 週時摘出腎を用いて網羅的な定量的プロテオミクスを実施した。更に、バイオインフォマティクスソフトを用い解析した。

ヒト培養系球体上皮細胞を用いて、分化の各段階におけるたんぱく発現解析をプロテオミクスにて行った。また高血糖下で培養を行い同じくたんぱく発現解析を行い、その制御因子の解析も行った。

当院で腎生検を行った FSGS 症例のミトコンドリア遺伝子解析 (外注)

4. 研究成果

4 週齢時においては低出生体重 (LBW) 群で正常出生体重 (NBW) 群に比し糸球体数が有意に少なかったものの、正常の腎組織像であった。一方、9 週齢時において LBW 群においてのみヒトの低出生体重関連 FSGS 症例と同様に FSGS 病変を形成しており、また GSECs の認められ、モデルの作成に成功した。4 週齢時の腎症を発症していない時期の腎組織を用い、定量的プロテオーム解析を行ったところ、LBW 群で有意に低下している機能蛋白群として酸化的リン酸化経路の subunit 蛋白、TCA サイクルの酵素群が上位に上がってきた。以上は、低出生体重個体においては腎症発症前からミトコンドリア機能異常が内在している可能性を示した。

ヒト糸球体上皮細胞 (human podocytes: HPs) は生体内においても培養系においてもミトコンドリアネットワークが成功に形成されていることがわかった。HPs は培養系での分化段階においてエネルギー代謝をより効率のよい酸化的リン酸化系へと移行していくことがわかった。一方で、高血糖下で培養した場合は逆に解糖系依存的になり、そこには LKB1-AMPK pathway が関与していることが示された。

低出生体重関連の FSGS 症例においてはミトコンドリア遺伝子異常は認めなかった。一方、一部の原因不明の糸球体硬化症症例で新たな Mit 遺伝子変型を認めた。

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4件)

Nakazato T, Ikehira H, Imasawa T.
Determinants of renal shape in chronic kidney disease patients.
Clin Exp Nephrol. 2016 Jan 20.

Imasawa T, Tanaka M, Maruyama N, Kawaguchi T, Yamaguchi Y, Rossignol R, Kitamura H, Nishimura M
Pathological similarities between low birth weight-related nephropathy and nephropathy associated with mitochondrial cytopathy.
Diagn Pathol 2014 9(1): 181.

Imasawa T, Tanaka M, Yamaguchi Y, Nakazato T, Kitamura H, Nishimura M.
7501 T>A mitochondrial DNA variant in a patient with glomerulosclerosis
Ren Fail 2014 Oct;36(9):1461-5

Imasawa T, Rossignol R.
Podocyte energy metabolism and glomerular diseases.
Int J Biochem Cell Biol. 2013 Sep; 45(9):2109-18

[学会発表](計7件)

今澤俊之
Metabolic Remodeling of Podocytes in Hyperglycemia
Toshiyuki Imasawa¹, Emilie Obre², Rodrigue Rossignol²
第18回 XVIII International Congress on Nutrition and Metabolism in Renal Disease (ICRNM2016)
シンポジウム Food, Energy, and Exercise
平成28年4月22日(沖縄)

今澤俊之
ワークショップ「腎臓における Developmental Origins of Health and Disease」
低出生体重と腎障害-ミトコンドリア機能異常の関与-第45回日本腎臓学会東部学術大会
平成27年10月2日 3日(東京)

Imasawa T, Rossignol R
Reduced mitochondrial energy production in the kidney induces focal segmental glomerulosclerosis in low-birth-weight rats at adulthood
48th Annual Meeting, The American Society of Nephrology
November 4-8, 2015 (San Diego, USA)

今澤俊之、川口武彦、首村守俊、山川貴史、渡邊真央、永田真依子、土屋洋平、西村元伸、北村博司
原因不明の糸球体硬化症における 7501 T>A ミトコンドリア DNA 変異の存在
第45回日本腎臓学会東部学術大会
平成27年10月2日 3日(東京)

今澤俊之、Rodrigue Rossignol
低出生体重個体におけるネフロン障害機序にはミトコンドリア・エネルギー産生能低下が関与する
(日本腎臓学会総会会長賞受賞)
第58回日本腎臓学会学術総会 平成27年6月5日-6月7日(名古屋)

Imasawa T, Obre E, Bellance N, Lavie J, Bénard G, Claverol S, Rossignol R.
Glomerular podocytes change their mitochondrial energy system in high glucose milieu
2015 ISN World Congress of Nephrology
March 13-17, 2015 (Cape Town, South Africa)

今澤俊之
腎病理ワークショップ「腎生検前にいかに臨床家が臨床情報から病理像をイメージするか-精度の高い診断、更にその先を目指して-」
日本腎臓学会東部学術大会
平成26年10月25日 26日(東京)

[図書](計1件)

今澤俊之
糖尿病性腎症の病態へのミトコンドリア障害の関与
糖尿病性腎症の病理と基礎研究の最前線(東京医学社)
腎と透析第78巻増刊号 p138-141

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.chiba-easthp.jp/introduction/rinsyou/section0100/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今澤 俊之 (IMASAWA, Toshiyuki)
国立病院機構 千葉東病院 診療部長・腎センター長・臨床研究部腎ミトコンドリア研究室長

研究者番号：80348276

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

田中雅嗣 (TANAKA, Masashi)
東京都健康長寿医療センター健康長寿ゲノム探索研究チームリーダー

山口裕 (YAMAGUCHI, Yutaka)
前東京慈恵会医科大学柏病院病理学教授

Rodrigue Rossignol
INSERM (U688 Physiopathologie Mitochondriale), Bordeaux Univ