

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860825

研究課題名(和文) 血漿イヌリンクリアランスを用いた低出生体重児の糸球体濾過率の基準値策定

研究課題名(英文) Reference value development of the glomerular filtration rate of the low birth weight infants using the plasma inulin clearance

研究代表者

西崎 直人 (NISHIZAKI, Naoto)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：30561435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では低出生体重児の成長後の腎障害について検討した。子宮内発育不全動物モデルを用い、成長後に腎障害が生じうることを、それを尿中アンギオテンシノーゲンという新規のバイオマーカーで早期発見できる可能性を立証した。また後天的に網膜症を生じるレベルの高濃度酸素暴露は腎臓でのネフロン形成の場である腎新生領域にも影響し、出生後の腎発達傷害をきたす可能性があることを動物モデルを用いて立証することが出来た。一方、ヒト新生児へのイヌリンクリアランスによる腎機能基準値の確立には至らなかった。

本研究結果は臨床現場において低出生体重児の成長後の腎障害を積極的に診療する根拠の一つになると考えた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined chronic renal impairment after the growth of the premature infants. First, urinary angiotensinogen (AGT) elevation prior to urinary protein levels is an useful biomarker to detect kidney impairment related prematurity. Second, renal impairment was caused by exposure to a hyperoxic environment during nephrogenesis, and the pathology of the impaired nephrogenesis in this oxygen-induced retinopathy animal model reflects the characteristics of retinopathy of prematurity observed in preterm infants. From these findings, the clinicians should observe renal function after the growth of the premature infants carefully.

研究分野：小児腎臓、新生児医療

キーワード：早産児 低出生体重児 ネフロン 慢性腎障害 未熟網膜症 酸素毒性 DOHaD

1. 研究開始当初の背景

本邦では少子・高齢社会が進み、出生数は年間 100 万を下回っている。しかし出生数は減じているものの、そのうち 2,500g 未満で出生する「低出生体重児」の割合は毎年増加している(図1)。

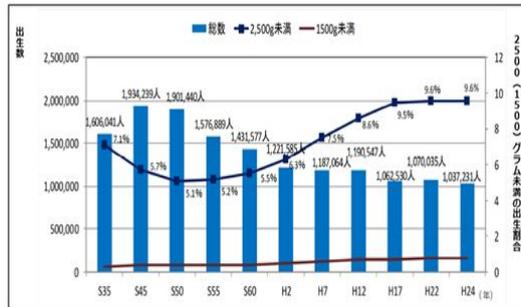
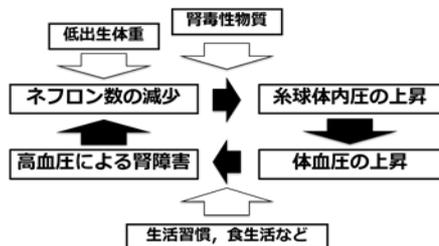


図1. 日本の出生数と出生体重の推移 (厚生労働省・人口動態統計ホームページより引用)

周産期医療の進歩によりこのような低出生体重児の救命率は向上したが、近年長期的な成長後の臓器障害発症リスクが明らかになってきた。これは「胎児期から出生後における種々の環境因子が成長後の疾病発症リスクに影響を及ぼす」という「生活習慣病胎児起源説」で説明可能である。

臓器別に考えると「腎臓」に関しては、尿をつくる組織の最少単位であるネフロンは胎児期の在胎 36 週頃まで増加する。つまりそれ以前に出生した早産児は生まれつきのネフロン数の「少なさ」が原因となり、出生以降には個々のネフロンへ過剰な負担が生じる。その結果、成長後になってネフロンは破綻・荒廃化し、結果的に糸球体硬化病変の発症や慢性腎臓病を生じることが報告されている。

しかし一方で、ヒトにおいて新生児期に救命集中治療を受けた早産児や低出生体重児の全例において成長後に腎機能障害を生じるわけではない。このことから出生後の腎毒性物質(抗菌薬、高濃度酸素、インドメサシン、ループ系利尿薬など)への曝露や生活習慣・食生活など何らかの後天的な要因の関与によって特定の個体だけに腎機能障害が顕在化することも想定される(図2)。



腎予後へ影響する因子
 先天因子: ネフロン数
 後天因子: 腎毒性物質曝露, 生活習慣・栄養など

図2. 低出生体重児の腎障害発症過程

このような背景から我々は日本で増加傾向にある低出生体重児とその成長後の腎障害発症機序に関して着目した。ヒトの糸球体発生は在胎 34 から 36 週まで続いているため、多くの早産児は腎発達途中で出生する。早産児においてみられる糸球体の形態異常や糸球体数の減少は出生後にも腎発達が障害された結果の可能性がある。しかしながら早産児における出生後の腎発達障害の原因や成長後に腎疾患を発症する機序についてはいまだ不明な点が多い。これらを解明するためには、動物モデルを用いた実験的検討とヒトにおける早産または低出生体重で出生した児の成長後の腎障害を評価するための基準値が必要となる。

2. 研究の目的

今回の目的は、大きく分けて 2 つである。1 つ目は 2 つの動物モデルを用いた実験的検討であり、(1) 動物実験を通じて未熟ラットが成長後、どのタイミングで腎障害を発症してくるのかを新規の腎障害を反映する尿バイオマーカー・アンジオテンシノーゲン (AGT) や腎の病理組織の評価をすることで検証することと、(2) ヒトの新生児医療の現場で救命のために頻用される酸素に着目し、酸素毒性が腎発達に悪影響を及ぼすのか否か動物モデルを用いて検証することである。具体的に後者では出生直後から後天的に高濃度酸素を投与したラットでは、未熟網膜症を発症することが知られているが、そのような病態下のラットにおいて同時に腎臓におけるネフロンへの悪影響(ネフロン数の減少など)が起こるのかを腎の病理組織や血管増生因子・VEGF などを用いて検証する。2 つ目はヒトを対象とした(3) 本邦で増加している低出生体重児の小児期における腎機能の評価に「血漿イヌリンクリアランス (Cin)」を用いて腎糸球体濾過量 (GFR) を測定し出生体重別の「正常 GFR 基準値」を策定することである。

3. 研究の方法

(1)「動物モデル・子宮内発育不全低出生体重 (FGR) ラットを用いた成長後腎障害発症の実験的検討」

妊娠 18 日の Sprague-Dawley ラットに両側子宮動脈結紮術または偽手術を行い、出生した仔ラットをそれぞれ胎児発育不全群 (FGR 群) とコントロール群として以下の評価を行った。

< 評価項目 >

体重: 出生時と出生後 4 週間毎に測定。

尿: 生後 4 週, 20 週, 32 週に採取。蛋白, クレアチン (Cre), AGT を測定。

血液: 生後 32 週の解剖時に採取し。尿素窒素 (BUN), Cre, AGT を測定。

なお、AGT は Rat Total Angiotensinogen Assay Kit (IBL 社) を用いて測定した。

腎組織: 生後 32 週で解剖 (HE 染色 糸球体

径の測定, PAS 染色 糸球体硬化の評価, MT 染色 間質の線維化の評価, 免疫染色 AGT 蛋白の発現量, RT-PCR AGT mRNA の発現量) を行った。

(2)「高濃度曝露による網膜症発症モデルラットの腎発達への影響の実験的検討」

出生直後の Sprague-Dawley ラットをもちいた。高濃度酸素投与群 (OIR 群) に対しては酸素濃度を自由に変更できる保育器 (Oxycycler ProOx model 110) を用いて、以下の条件下で網膜症発症モデルラットの作成を行った。

<高濃度酸素投与プロトコール>

80%酸素下で飼育開始

24 時間毎に 0.5 時間 21%酸素へ

その後 3 時間かけて 80%酸素へ

①~③の行程を 12 日間繰り返す

一方で、コントロール群は大気下で飼育した。両群ともに日齢 12 から日齢 19 までは大気下で飼育し、糸球体発生および網膜血管新生段階である日齢 5 と糸球体発生および網膜血管新生の終了する日齢 19 に腎臓と網膜を採取した。腎臓ではネフロン発生の場となる Nephrogenic zone の面積と VEGF を RNA レベルで検討した。

4. 研究成果

(1)「動物モデル・子宮内発育不全低出生体重 (FGR) ラットを用いた成長後腎障害発症の実験的検討」

まずは FGR ラット群 (10 匹) およびコントロール群 (10 匹) の体格の比較を出生時とヒトでは成長後の壮年期にあたる 32 週時点で比較したところ、出生時の体格は FGR 群ではコントロール群と比較して出生体重が有意に低値 (6.55 ± 1.59 v.s. 7.82 ± 0.65 , $p < 0.05$) であった。一方で 32 週時点では両群間の体重, 身長, 腎重量/体重比, 腎長径/身長比に有意差を認めなかった。

一方、4 週、20 週、32 週時点での腎機能障害を反映する尿蛋白および尿中 AGT を比較したところ、20 週の時点では FGR 群で尿蛋白に先行して尿中 AGT が有意に上昇していた (1.44 ± 0.13 v.s. 0.12 ± 0.02 mg/g Cr, $p = 0.001$)。32 週時点では両群ともに尿中の腎障害マーカーは上昇していたが、血液検査における血清 BUN, Cre, AGT には両群間で有意差は認めなかった。腎組織の評価では、32 週時点での FGR 群で mRNA の発現量が有意に高値であった (1.88 ± 0.12 v.s. 0.83 ± 0.05 , relative ratio to one randomly selected control rat, $p = 0.007$)。糸球体の硬化度を表す硬化度 Index も同様に 32 週時点での FGR 群で有意に高値であった (図 3)。

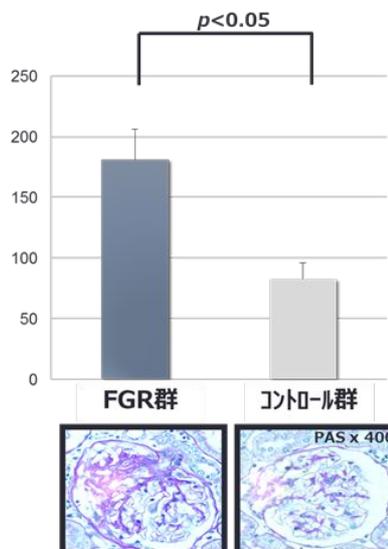


図 3. 32 週時点の糸球体硬化 Index

以上より、FGR 群では 20 週時に尿蛋白出現に先行して尿中 AGT が上昇していたことから尿中 AGT は従来の検尿異常 (蛋白尿出現) に比べ FGR に起因する腎障害をより早期に発見可能なバイオマーカーである可能性がある。また FGR 群は 32 週時に腎の組織障害 (糸球体硬化) を認めたが血中パラメータ、血中 AGT には両群間に有意差なかったことから FGR に起因する成長後の腎障害は頻用される既存の血液パラメータ (BUN や Cre) だけでは発見が難しい可能性や、血中 AGT には差がなかったことから FGR 群の尿中 AGT 高値は腎局所のレニンアンジオテンシン系活性化による傷害を特異的に反映している可能性が示唆された。加えて FGR 群の 32 週時の糸球体硬化 index 高値の意義としては、ヒトにおいての既報と同様に糸球体での「過剰濾過状態」の存在を示唆していると考えられた。今回得られた知見は、動物モデルを介しての初の立証であり、今後新生児医療の現場で低出生体重であった児の成長後の腎障害は尿中 AGT などより鋭敏なマーカーによる早期発見が可能になると我々は考えた。

(2)「高濃度曝露による網膜症発症モデルラットの腎発達への影響の実験的検討」

まずは高濃度酸素負荷新生仔ラット (OIR 群) において実臨床で認められる網膜症が再現できるのか検討した。日齢 19 に両群 (各 8 匹) のラットの網膜を剥離したところ、OIR 群では網膜辺縁の無血管領域と異常な新生血管を認め、網膜症 が再現されていた。

つづいて日齢 5 におけるネフロン発生の場となる Nephrogenic zone の距離を検証したところ、腎被膜からの深さは OIR 群で有意に Nephrogenic zone の狭小化が認められた (160.01 ± 3.84 μ m v.s. 124.2 ± 3.30 μ m, $p < 0.05$) (図 4)。

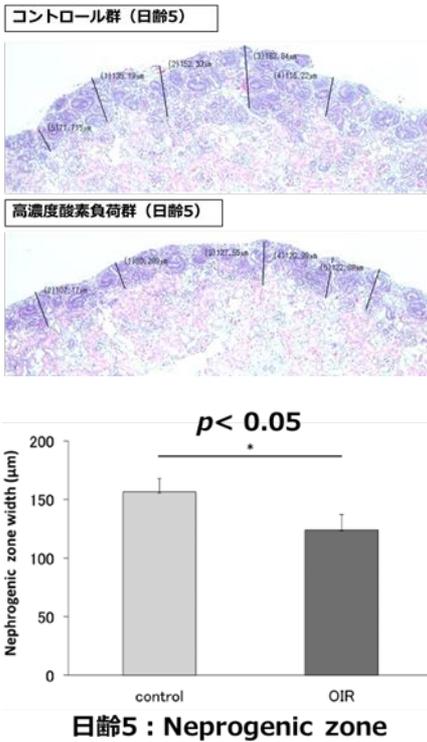


図 4. コントロール群と OIR 群の Nephrogenic zone の比較 (日齢 5)

一方、発達期の腎臓において、糸球体形成過程では糸球体上皮細胞が血管前駆細胞の分化を誘導する。形成された糸球体上皮から分泌された VEGF-A は VEGFR-2 受容体を発現する血管前駆細胞の血管内皮への分化を誘導する。さらに血管内皮から PDGF (platelet-derived growth factor) が分泌され、そのレセプターである PDGFR- を発現する血管前駆細胞が分化しメサンギウムが形成されることが知られている。そこで網膜および腎臓のネフロン発生に関わる血管増生因子・VEGF-A と PDGF- の mRNA 発現量を解析したところ、OIR 群で日齢 5 に有意に減少し (0.60 ± 0.01 v.s. 0.69 ± 0.02 , relative to one randomly selected control rat, $p < 0.01$)、日齢 19 に有意に増加していた (1.432 ± 0.22 v.s. 0.86 ± 0.13 , relative to one randomly selected control rat, $p = 0.0004$)。これらの得られた知見から高酸素環境により、発達期 (日齢 5) の腎臓における VEGF-A の発現が低下し、PDGF- の発現低下を招き、Nephrogenic zone の狭小化および糸球体数減少をもたらしたと推察された。また、大気下に戻したことで、日齢 19 には VEGF-A と PDGF- の発現が亢進したと考えられた。高酸素環境による腎発達障害には ROP と同様に VEGF-A が関与している可能性が推察された。

以上(2)の検討では早産児 (ラットでは正期産で出生した場合、ヒトにおける早産・約 28 週に相当) では出生後も腎発達が網膜発達と同様に続いており、出生後の高濃度酸素という後天因子の負荷によって腎発達と網膜が共に病的状況に晒されてそれぞれ傷害さ

れることが判明した。両者の病態は類似している可能性があり、OIR ラットモデルは、早産児の腎発達障害の機序の解明に役立つ可能性が示唆された。

(3)「血漿イヌリンクリアランス (Cin) を用いて腎糸球体濾過量 (GFR) を測定し出生体重別の正常 GFR 基準値を策定」

今回の研究対象期間では、早産または低出生体重で出生した児の成長後に基準値策定のためのイヌリンクリアランス測定に同意し検査値を提供してくれる被験者が得られなかった。原因としてはイヌリンクリアランスの測定検査の経験が少なく、既存の Cre や尿検査所見で評価することを望む被験者が大部分であったこと、また新生児期に腎毒性物質に曝露された早産児や低出生体重児が多く、基準値策定には不向きであったことが想定された。今後は多施設共同での被験者のリクルートを検討する必要がある。

<まとめ>

日本の周産期・新生児医療のレベルは新生児死亡率の低さから見れば世界トップのレベルまで到達した。生存限界に近い在胎 20 週前半や 500g を下回る出生体重の児が生存退院し、その多くが成人に達することが可能となってきた。しかし真の「後遺症なき生存」とはこれまで注目されてきた精神運動発達の評価のみではなく、各臓器へおよびサイレントな後遺症にも着目し、克服しなければならない。本研究のテーマである「早産・低出生体重と成長後の腎障害」に関して、今回得られた腎の最小単位・ネフロンのレベルでの障害を早期発見する事、また後天的な要素によって成長段階にある腎臓 (特に Nephrogenic zone) に対して出生後に曝露される高濃度酸素の影響も無視できない可能性があることを示すことが出来た。今後は出生後の急性期の治療に関わる新生児科医と小児医療の中でも腎臓専門のフォローアップが出来る医師と早産・低出生体重のお子さんを持つ保護者との間で共通認識を持ち、腎障害が生じた場合の早期発見・早期治療に繋がるように啓発していく必要があると考える。

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 2 件)

Nakagawa M, Nishizaki N, Endo A, Someya T, Saito Y, Mizutani A, Hara T, Murano Y, Sakuraya K, Hara S, Umino D, Hirano D, Fujinaga S, Ohtomo Y, Shimizu T, Impaired nephrogenesis in neonatal rats with oxygen-induced retinopathy, *Pediatr Int*, 査読あり, 2017 Feb 16. doi: 10.1111/ped.13264.

Murano Y, Nishizaki N, Endo A, Ikeda N, Someya T, Nakagawa M, Hara T, Sakuraya K, Hara S, Hirano D, Suzuki M, Shoji H, Fujinaga S, Ohtomo Y, Shimizu T、Evaluation of kidney dysfunction and angiotensinogen as an early novel biomarker of intrauterine growth restricted offspring rats、査読あり、Pediatr Res、 2015 Dec;78(6):678-82.

仲川 真由 (NAKAGAWA, Mayu)
順天堂大学・医学部・非常勤助教
研究者番号：未取得

平野 大志 (HIRANO, Daishi)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：90424663

〔学会発表〕(計5件)

仲川 真由、西崎 直人、遠藤 周、染谷 朋之介、水谷 亮、原 太一、村野 弥生、平野 大志、齋藤 雄太、藤永 周一郎、大友 義之、清水 俊明、高濃度酸素負荷新生仔ラットにおける網膜症と腎障害の関連、第51回日本小児腎臓病学会、2016年7月8日、ウインクあいち(愛知県・名古屋市)

仲川 真由、西崎 直人、遠藤 周、染谷 朋之介、藤永 周一郎、大友 義之、清水 俊明、高濃度酸素負荷新生仔ラットにおける網膜症と腎障害の関連、第59回日本腎臓学会、2016年6月17日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

村野 弥生、西崎 直人、池田 奈帆、鈴木 光幸、東海林 宏道、清水 俊明胎児発育遅延モデルラットでの成長後の腎機能評価とアンジオテンシノーゲンの早期マーカーとしての有用性、第51回日本周産期・新生児医学会、2015年7月12日、ヒルトン福岡シーホーク(福岡県・福岡市)

村野 弥生、西崎 直人、染谷 朋之介、遠藤 周、池田 奈帆、仲川 真由、原 太一、櫻谷 浩志、原 聡、平野 大志、鈴木 光幸、東海林 宏道、藤永 周一郎、大友 義之、清水 俊明、胎児発育遅延モデルラットでの成長後の腎機能評価とアンジオテンシノーゲンの早期マーカーとしての有用性、第50回日本小児腎臓病学会、2015年6月18日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

西崎 直人、腎内レニン・アンジオテンシン系の意義と臨床応用 新生児における尿中アンジオテンシノーゲンの意義、第118回日本小児科学会、2015年4月19日、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西崎 直人 (NISHIZAKI, Naoto)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：30561435

(4) 研究協力者

村野 弥生 (MURANO, Yayoi)
順天堂大学・医学部・非常勤助教
研究者番号：80771922