

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09726

研究課題名(和文) 早産によるネフロン形成早期終止におけるHIFの役割解明と治療の試み

研究課題名(英文) Analysis of the role of HIF in early termination of nephrogenesis due to prematurity and development of treatment.

研究代表者

飛弾 麻里子(Hida, Mariko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：20276306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、早産児におけるネフロン数の減少の発生機序の解明である。早産児は子宮外での相対的高酸素に暴露されることから、hypoxia inducible factor (HIF)の発現・活性低下がネフロン形成早期停止に影響するという仮説を立てた。低酸素環境下で飼育した新生児マウスのネフロン形成とHIF発現、活性の比較検討を予定したが検証に値する期間の飼育は困難であった。早産モデルマウスの飼育も困難で、ネフロン形成早期停止が示唆された個体もあったが、全体として有意差は出なかった。生きながらえても全身状態不良で、HIFの発現・活性以外の因子の影響が強いと判断し、十分な結果を得られなかった。

研究成果の概要(英文)：We have been analyzing the mechanism of early termination of nephrogenesis in preterm infants. Since a neonate is exposed to higher level of oxygen than in utero, we had hypothesized that the change in expression and activity of hypoxia inducible factor (HIF) would influence on maintenance of nephron progenitor cells, vasculisation, and nephrogenesis. We planned to create preterm model mice and to raise them under hypoxic condition. We had examined the expression and activity of HIF in those model mice. Unfortunately to create preterm mice had been quite difficult. We have succeeded to create one-day-preterm mice, which pathological study suggested that nephrogenesis may terminate earlier than term mice, but we could not raise enough number of model mice for examination. To raise mice under hypoxic condition was also quite difficult. Since they were quite sick under hypoxic condition, we could not make enough assessment. We need to analyze in vitro with organ culture specimens.

研究分野：小児科、新生児・胎児

キーワード：糸球体減少 早産児 低酸素環境

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)は腎不全のみならず心血管疾患の独立した危険因子である。近年、生活習慣病、CKDの発症が胎児期、周産期のイベントに影響されることが明らかになった(DOHaD 仮説)。CKDの発症機序はネフロン数減少と考えられている。ネフロン数は10倍以上に及ぶ個人差があり、低出生体重により減少する。低出生体重は腎疾患の発症、重症化のリスクである。過去の研究では宮内発育遅延(IUGR)による低出生体重と早産による低出生体重を区別しておらず IUGRの重要性が強調されていたが、近年、早産も重要なネフロン数減少因子であることが明らかになりつつある。ヒト早産児の剖検例では生後40日でネフロン形成が終止することが報告されている。正期産児のネフロン形成は胎生34-36週まで続く。成育限界である22週で出生した児は修正28週でネフロン形成が終止することになり、ネフロン数が減少することになる。

ネフロンは尿管芽と後腎間葉細胞の相互作用により形成される。尿管芽先端の後腎間葉細胞はcap mesenchymeと呼ばれ自己複製能、分化能を持ちネフロン前駆細胞と考えられている。ラットにおいて胎生期は尿管芽先端に1個の、生後は複数のネフロンが形成される。ヒトの尿管芽分岐は胎生22週に終止するため早産児におけるネフロン形成早期終止は主にネフロン前駆細胞の問題と考えられる。また、ヒト早産モデルにおいてはヒトと異なりネフロン数は減少しないが、生後に形成された糸球体形態は異常であり、ポドサイトのみで毛細血管が観察されない糸球体がみられる。異常糸球体はヒト早産児においても報告されている。

早産児特に胎生28週末満の超早産児は呼吸障害による低酸素、低栄養、また循環不全、感染、動脈管開存に対し使用するグルココルチコイド、アミノグリコシド、NSAIDに暴露され急性腎障害を合併することが多い。これらの薬剤が新生児に投与されるとネフロン数を減少し、器官培養系では尿管芽分岐を抑制するが、ネフロン前駆細胞への影響は不明である。一方、生後の種々の侵襲は活性酸素(ROS)を産生する。ROSはネフロン前駆細胞、血管新生を障害することが知られている。以上から早産児においてネフロン数が減少する原因として以下の3つが考えられる。

- (1)胎生22週以前における尿管芽分岐抑制
 - (2)ネフロン前駆細胞の消失
 - (3)血管発生障害による異常糸球体の形成
- このうち2、3は子宮外相対的高酸素および生後の種々の侵襲により生じると考えられる。

Hypoxia inducible factor (HIF)は低酸素により誘導される遺伝子のプロモーターに存在するhypoxia response elementに結合する転写因子であり、低酸素に応答するmaster geneである。腎発生過程において

HIFの発現が成熟と共に減少することが知られている。これは腎血管の発達により組織への酸素供給が増加するためと考えられる。またネフロン前駆細胞の分化は血管発達に伴い進行することが最近報告された。早産による子宮外相対的高酸素曝露によりHIF発現が低下、ネフロン前駆細胞が自己複製より分化の方向に傾き早期消失をきたすと考えられる。またHIFはVEGF、PDGF、bFGFを介し血管新生を誘導し、生後の種々の侵襲はROS産生を介し間接的にもネフロン前駆細胞、血管新生を障害すると考えられる。HIFはROS産生(酸化ストレス)を抑制する。HIFの活性化が腎保護的に作用することは種々のモデル(腎虚血再還流、腎炎など)により示されている。早産モデルにおいてもPHD阻害薬によるHIF発現増加は相対的高酸素の効果およびROS産生を抑制することにより直接的、間接的な障害を抑制すると考えられる。(下図)

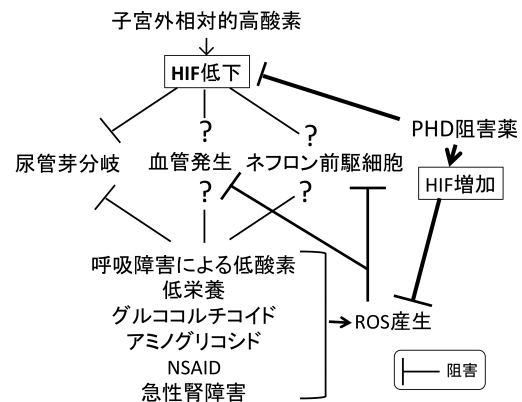


図 早産児におけるネフロン形成早期終止機序と治療

本邦の全体の出生率が低下するなか、早産児の出生数は減少せず、早産率はむしろ上昇傾向である。早産児の健康の維持は、将来的な国民全体の健康に寄与する重要な案件である。

2. 研究の目的

本研究ではこれらの原因が子宮外相対的高酸素によるhypoxia inducible factor (HIF)の発現・活性低下であるという仮説を検証する。HIFはネフロン前駆細胞の維持、血管新生、および腎障害因子による酸化ストレスの抑制に必要であると推測する。またHIFの分解酵素prolyl hydroxylase (PHD)の阻害薬を用い、早産によるネフロン数減少の治療をマウス、ラット早産モデルおよび器官培養系を用い試みる。

3. 研究の方法

- (1) 早産のネフロン形成終止への影響：マウスまたはラット早産、正期産新生児腎臓および高・中・低酸素濃度環境下後腎器官培養に

おけるネフロン前駆細胞のマーカーCited1、Six2 の発現の検討

(2) 早産の腎 HIF 発現への影響：上記のモデルにおける HIF-1、HIF-2 の発現の経時的な検討

(3) 早産の糸球体毛細血管形成への影響：マウスまたはラット早産、正常産新生仔における糸球体血管形成を CD34、CD31 染色により評価

(4)ラット早産新生仔における出生後侵襲のネフロン形成への影響：早産ラットおよび修正日齢の一致する正常産ラットにおけるインドメサシンのネフロン形成終止、糸球体形態、成熟後のネフロン数への影響、およびその機序が ROS を介するかの検討

(5) PHD 阻害薬のネフロン形成終止、糸球体毛細血管形成、出生後侵襲によるネフロン形成への影響：早産単独、早産+出生後侵襲ラット新生仔への PHD 阻害薬のネフロン形成への効果およびその機序が HIF、ROS を介するのかの検討

4 . 研究成果

平成 27 年度は、HIF がネフロン前駆細胞と相関して発現することの確認、低酸素状態で HIF の発現を刺激することがネフロン前駆細胞に起こす変化の評価を計画した。さらに、早産モデルマウスの作成、腎形態の経時的観察(nephrogenic zone の厚さ、糸球体原基のステージ毎の比率、形成された糸球体の形態)を予定した。また腎溶解液のウェスタンブロットにより腎ネフロン前駆細胞のマーカーCited 1 の発現を正常産マウスと比較することを予定した。

早産児のネフロン数が少ない原因として酸素濃度が低い子宮内から予定より早く相対的に高酸素の子宮外環境への曝露が考えられる。これを支持するデータとして低酸素環境で発現する Hypoxia-inducible Factor (HIF)の発現がネフロン前駆細胞と相関して血管の発達とともに減少することが示されている。ネフロン前駆細胞はマウスでは生後 3 日で消失するが、低酸素環境においてはその消失時期が延長される可能性がある。

妊娠 ICR マウスを低酸素チャンバー(酸素 10%)に妊娠 18 日より収容し、出生した(妊娠 19 日)新生仔の腎臓を摘出、ウェスタンブロットによりネフロン前駆細胞のマーカーである Cited 1 の発現を対照の新生仔と比較した。マウスは通常妊娠 20 日であり、また生後もネフロン形成が持続するため、妊娠 19 日の新生仔はヒトの早産児と同等と考えている。

低酸素環境では胎仔の死亡率が高く、経時的に腎臓を採取する予定であったが生後 0.5 日と 2.5 日のサンプルしか採取できなかった。また活動度は低く、全身状態不良と考えられ、その影響が腎臓に及ぶ可能性も懸念された。Cited 1 のウェスタンブロットによる検討で

は日齢の一致した対照との差は認められなかった。また日齢 3 日以降のサンプルが得られなかったため低酸素によりネフロン前駆細胞消失が延長するか否かを検証できなかった。

平成 28 年度はマウス早産モデル作成を試みた。結果として母体帝王切開により成長可能な最も早い胎齢は胎生 17 日であった(通常 18 日で出生)。胎生 16 日で蘇生する新生仔もあったが哺乳できず 1-2 日で死亡してしまった。早産マウスではネフロンが形成される nephrogenic zone が生後 7 日まで観察され、8 日(修正日齢 7 日)には消失した。対照マウスでは生後 8 日に若干 nephrogenic zone がみられ、完全に消失するのは 9 日であった。従って早産マウスでは本来予想される日より 1-2 日前にネフロン形成が終止することが示された。ネフロン前駆細胞のマーカー Cited 1 の発現は nephrogenic zone 消失に先立ち約日齢 3 日前で消失すると言われていた。Cited 1 発現を western blot により検討したが、研究期間内には十分な結果を出すことができなかった。低酸素のマーカー HIF1a、HIF2a 発現を評価する予定であったが、これらは western blot では検出できなかった。低酸素にした胎仔をサンプルとし複数の抗体を用いて検討したものの不可能であった。

平成 29 年度は、28 年度に引き続きマウス早産モデル作成を試みた。平成 29 年度の早産マウスは帝王切開後の呼吸障害を脱しても、代理母からの授乳がうまくいかないせいか、数日間生存する仔の数は限られた。また最も早い時期に生存可能なのは E18.5 であった。自然分娩のばらつきの範囲内であり、対照と差が認められたとしても出生時間の差なのか、呼吸、栄養の差によるのか判定不能であった。かろうじて 12 時間早く生まれて生き延びた新生仔腎を対照仔と比較したところ nephrogenic zone は日齢 8 でほぼ消失、対照と変わらなかった。すなわち早産ではネフロン形成が早期に終止するという仮説を立証することはできなかった。ネフロン前駆細胞のマーカーCited1 を経時的に比較したが、早産、対照ともに生後 9 日まで発現していた。生後 3 日で Cited 1 発現が消失するという過去の報告と異なる理由は、ウェスタンブロットで評価したため過去に用いられた免疫組織染色より感度がよく後期まで検出できたためと判断した。結論としてマウスで対照と明らかな差がみられる早産モデルを作成するのは困難であり、予定した成果を出すことができなかった。

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 12 件)

(1)Awazu M, Nagata M, Hida M, BMP7 dose-dependently stimulates proliferation and cadherin-11 expression via ERK and p38 in a murine metanephric mesenchymal cell line. *Physiol Rep*. 査読あり. 4, 2017,e13378. DOI 10.14814/phy2.13378.

(2)Asada N, Tsukahara T, Furuhata M, Matsuoka D, Noda S, Naganuma K, Hashiguchi A, Awazu M. Polycythemia and peritubular capillary rarefaction in two adolescents born very prematurely. *Pediatric Nephrol*. 査読あり .32,2017:1275-78.DOI: 10.1007/s00467-017-3654-z.

(3) Awazu M et al. Tubular dysfunction mimicking Dent's disease in 2 infants born with extremely low birth weight. *Case Rep Nephrol Dial*. 査読有り .7,2017:13-17.DOI: 10.1159/000455828.

(4) Tominaga T, Sato T, Ichihashi Y, Amano N, Kobayashi Y, Awazu M. Transient Fanconi syndrome in two preterm infants with hydronephrosis and urinary tract infection. *CEN Case Rep*. 査読あり . 6,2017:88-90.
[URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Transient+Fanconi+syndrome+in+two+preterm+infants+with+hydronephrosis+and+urinary+tract+infection](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Transient+Fanconi+syndrome+in+two+preterm+infants+with+hydronephrosis+and+urinary+tract+infection)

(5)粟津緑. 腎臓病への DOHaD の影響 尿細管・間質、血管. *小児内科* 査読無し 49,2017:493-496 オープンアクセスなし。

(6)粟津緑 ネフロン数. *腎臓内科・泌尿器科*. 査読なし .5,2017:356-360.

(7) 飛弾麻里子、阿部時也、橋口明典、粟津緑. 母体低栄養は片側尿管結紮による腎障害を増悪する -ラットモデルを用いた検討- *発達腎研究会誌* 査読無し 25, 2017:30-33.

(8)粟津緑. Nephrogenesis に影響する因子. *日腎誌* 査読無し 59,2017:1233-1236.

(9) 粟津緑、飛弾麻里子. 正常後腎発生および母体低栄養ラット後腎の尿管芽分岐、ネフロン数減少における DNA メチル化の役割. *発達腎研究会誌* 査読無し 24,2016:9-12.

(10) 粟津緑、飛弾麻里子. 母体低栄養によるラット後腎の全般的および遺伝子特異的低下メチル化. *発達腎研究会誌* 査読無し 23, 2015:8-10.

〔学会発表〕(計 31 件)

(1)Awazu M, Nagata M, Hida M. “Cadherin-11 is induced by BMP7 and stimulates cap mesenchyme formation” *Kidney Week 2017(国際学会)*,2017 年

(2)Hida M, Oda M, Awazu M. “DNA hydroxymethylation is altered by maternal nutrient restriction in rat kidney” *Kidney Week 2017(国際学会)*, 2017 年

(3)Asada N, Matsuzaki Y, Awazu M “Polycythemia in subjects born with a history of preterm birth and extremely low birth weight” , *Kidney Week 2017(国際学会)*, 2017 年

(4)Matsumura K, Shibata H, Ishii T, Hasegawa T, Awazu M “Effect of growth hormone therapy on renal function in children born small for gestational age” , *Kidney Week 2017(国際学会)*, 2017 年

(5)Tominaga T, Omori S, Awazu M, “Transient hypertension in a preterm infant after the administration of indomethacin for patent ductus arteriosus” *Kidney Week 2017(国際学会)*, 2017 年

(6)Asada N, Matsumura, K., Tsukahara T, Matsuoka D, Furuhata M, Noda S, Naganuma K, Hashiguchi A, Awazu M, “Polycythemia and peritubular capillary rarefaction in subjects with a history of preterm and extremely low birth weight” *The 15th Japan-Korea-China Pediatric Nephrology Seminar(国際学会)*, 2017 年

(7)粟津緑「Nephrogenesis に影響する因子」第 39 回腎臓セミナー・Nexus Japan(招待講演)2017 年

(8)塚原 孝典、松岡 大輔、日高 義彦、中沢 洋三、野田 俊輔、浅田 礼光、粟津緑、長沼 邦明、森 哲夫「巣状糸球体硬化症と多血症を合併した早産・超低出生体重児の 2 例」第 120 回日本小児科学会、2017 年

(9)浅田礼光、松村和哉、松崎陽平、池田一成、粟津緑「超低出生体重で出生した児における多血症の検討」第 120 回日本小児科学会、2017 年

(10)飛弾麻里子 他。「生後早期尿中 L 型脂肪酸結合蛋白 L-FABP 高値は新生児仮死の神経学的予後不良を示唆する」第 120 回日本小児科学会、2017 年

(11)粟津緑、長田道夫、飛弾麻里子「カドヘリン 11 は BMP7 により誘導され cap mesenchyme 形成を促進する」第 60 回日本腎臓学会、2017 年

(12)飛弾麻里子「重症新生児仮死児における急性期尿細管機能障害と神経学的予後との関連」第 52 回日本小児腎臓病学会、2017 年

(13)浅田礼光、松村和哉、松崎陽平、池田一成、粟津緑
“ Polycythemia in subjects born with a history of preterm birth and extremely low birth weight ” 第 52 回日本小児腎臓病学会、2017 年。

(14)松村和哉、柴田 浩憲、石井 智弘、長谷川 奉延、粟津緑。「SGA 性低身長症児に対する成長ホルモン療法の腎機能への影響」第 52 回日本小児腎臓病学会、2017 年

(15)大森さゆ、富田 紘史、薄井 摩稚子、粟津緑。「発表標題 短腸症候群による低栄養、成長障害の改善に伴い GFR 低下の増悪を認めた超低出生体重児の 1 例」第 52 回日本小児腎臓病学会、2017 年

(16)野田俊輔、塚原孝典、松岡大輔、日高義彦、粟津緑。「巣状糸球体硬化症と多血症を合併し、尿細管周囲毛細血管の菲薄化を認めた早産・低出生体重児の 2 例」第 26 回発達腎研究会、2017 年

(17)飛弾麻里子「NICU 卒業生は CKD 候補生？早産/低出生体重と腎発生」
東北大学病院 総合周産期母子医療センター 新生児科指導医養成事業 第 7 回新生児科指導医教育セミナー（招聘講演）2017 年

(18)飛弾麻里子、阿部 時也、橋口 明典、粟津 緑。「母体低栄養ラットにおける片側尿管結紮による腎障害の増悪機序 -腎 NO 産生の低下-」第 51 回日本小児腎臓病学会学術集会、2016 年

(19)粟津緑、山口良文、三浦正幸、飛弾麻里子。「母体低栄養による尿管芽分岐抑制・ネフロン数減少における caspase-3 の役割」第 51 回日本小児腎臓病学会学術集会、2016 年

(20)粟津緑、飛弾麻里子「葉酸は母体低栄養・メチル酸ドナー欠乏による尿管芽分岐・ネフロン数減少を改善する」第 59 回日本腎臓学会学術集会、2016 年

(21)M Awazu, Y Yamaguchi, M Miura, M Hida.
“ Caspase-3 Mediates Inhibition of Ureteric Branching and Nephrogenesis by Maternal Nutrient Restriction in Mice ”, Kidney Week 2016 (国際学会), 2016 年

(22)M Hida, T Abe, A Hashiguchi, M Awazu.
“ Aggravated Unilateral Ureteral Obstruction-Induced Renal Injury in Rat Offspring with Maternal Nutrient Restriction Is via Decreased Renal Nitric Oxide Production ”, Kidney Week 2016 (国際学会), 2016 年

(23)粟津緑。「腎臓における Developmental Origins of Health and Disease オーバービューメカニズム」第 58 回日本腎臓学会(招待講演)、2015 年

(24)飛弾麻里子、阿部時生、橋口明典、粟津緑。「母体低栄養ラット片側尿管結紮モデルにおける尿細管壊死、間質線維化の悪化」第 50 回日本小児腎臓病学会、2015 年

(25)粟津緑、飛弾麻里子。「DNA メチルトランスフェラーゼ 1 のラット後腎発生、母体低栄養による腎形成異常における役割」第 50 回日本小児腎臓病学会、2015 年

(26)M Hida, T Abe, A Hashiguchi, and M Awazu. “ Maternal nutrient restriction aggravates renal tubular necrosis and interstitial fibrosis after unilateral ureteral obstruction in rat offspring. ” Kidney Week 2015(国際学会), 2015 年

(27)M Awazu, M Hida
“ Folic acid alleviates reduced ureteric branching and nephrogenesis induced by maternal undernutrition in rat embryonic kidney. ” Kidney Week 2015(国際学会), 2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

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:20129315