

平成 31 年 4 月 20 日現在

機関番号：82506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09638

研究課題名(和文) 低出生体重個体における腎症発症機序へのミトコンドリアの関与を解明する

研究課題名(英文) The role of mitochondria in the pathogenesis of low birth weight-related nephropathy

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)・腎センター・腎センター長

研究者番号：80348276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：低出生体重個体ラット(N=5)と正常出生体重個体(n=5)の4週齢時に摘出した腎から、糸球体を単離した。単離糸球体を培養し糸球体上皮細胞初代培養も行った。糸球体および初代培養ポドサイトから、トランスクリプトーム解析を行っている。今後、bioinformatics解析にて病態関連候補遺伝子を検討し、当該遺伝子のプロモーター領域のエピジェネティクス解析を行う。低出生体重ラット腎のプロテオーム解析のbioinformatics解析から、ミトコンドリア機能低下や解糖系の活性化の上流にmTOR系の活性化があることがわかり、各種抗体を用いた染色の検討を行い、mTOR系の活性化を組織学的にも確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本では2500g未満の「低出生体重」児の割合が約10%とOECD加盟国の中において極めて高い。一方、「将来の健康や特定の病気へのかかりやすさは、胎生期を中心とした極めて初期にその素因が形成される」というDOHAD説を裏付けるように低出生体重個体に於いて腎症の発症や重症化の危険率が高いことを示す報告は枚挙に暇がなく、将来の我が国の疾病構造に現在のこの高い低出生体重率が影響することが懸念されている。未だ検討半ばであるが、低出生体重関連腎症の病態解明を進めることにより、将来起こりえる低出生体重に関連した腎障害に対する対策を行うのに有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Glomeruli were isolated by the sieving method from kidneys at 4 weeks of age of low birth weight (LBW) rat (N = 5) and normal birth weight ones (n = 5). The isolated glomeruli were cultured and primary culture of glomerular epithelial cells was also performed. Transcriptome analysis of RNA extracted from the obtained glomeruli and primary culture podocytes is outsourced. In the future, we plan to perform epigenetics analysis of the promoter region of the gene which should be expected as candidate genes by the bioinformatics analysis. In addition, by proteome analysis of LBW rat kidney, it was found that mTOR system should be upstream of mitochondrial dysfunction and glycolytic activation in LBW rats. The staining experiments by using antibodies against mTOR pathway revealed that mTOR pathway should be activated in human cases of low-birth related kidney disease.

研究分野：腎臓病

キーワード：低出生体重 巣状分節性糸球体硬化症 DoHAD ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

疾病および健康は胎生期を中心とした極めて初期にその素因が形成されるという Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) という概念が広まりつつある。そして、低出生体重が、成人期腎症の発症・進展に悪影響を与えるという観察研究も申請者らを含めなされてきた (Imasawa et al. Ther Apher Dial 2013, Vikse et al. J Am Soc Nephrol 2008)。そのような中、申請者は平成 24 年度から科学研究費補助金の課題とし「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」を実施し、低出生体重歴のある腎症症例の病理・遺伝解析を行い、ヒト低出生体重関連腎症の発症にミトコンドリア機能異常が関与する可能性を報告した (Imasawa et al. Diagn Pathol 2014)。また、ミトコンドリア・エネルギー産生機構の破綻が腎症発症に関与する可能性についても発表した (Imasawa et al. Int J Biochem Cell Biol 2013)。また、それらの結果を受け、母体へのステロイド投与により得た低出生体重ラットを用いた基礎実験を行い、9 週齢時にヒト低出生体重関連腎症と酷似した糸球体・間質病変を呈する実験モデルを確立することができました。このモデルでは 4 週齢時には腎病変を伴っていなかったことから、4 週齢時の低出生体重ラットと正常出生体重ラットの腎を比較することで、将来的に腎病変へと繋がる“素因”を見出せると考えた。そこで、両者間での発現蛋白の相違を定量的プロテオームで解析した結果、ミトコンドリア機能、とりわけエネルギー産生に関与する蛋白群が低出生体重個体では多く減少していることがわかってきていた。

2. 研究の目的

母体へのステロイド投与により得た低出生体重ラットを用いた基礎実験の結果は、ステロイドの影響について問題を指摘されてきたため、より社会的な問題となっている妊娠中の低栄養に基づく低出生体重個体における腎症発症機序についてミトコンドリアの関与につき本研究では検討することを目的とした。

3. 研究の方法

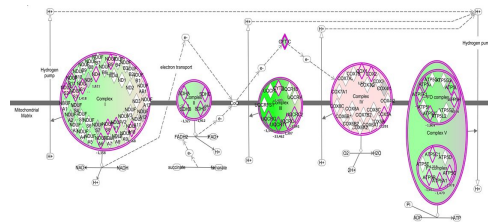
食餌制限による低出生体重ラットと、食餌制限なしの母体から生まれた正常出生体重ラットから、各々 4 週齢に腎を摘出する。摘出した腎からシーピング法にて糸球体を単離する。単離した糸球体の一部を培養し、ポドサイト初代培養を行い、7 日目に回収。上記で得た、糸球体とポドサイトから抽出した RNA のトランスクリプトーム解析を行い、発現変化の大きい遺伝子については、当該遺伝子プロモーター領域のエピジェネティクス解析を行う。

母体へのステロイド投与にて生まれた低出生体重ラット腎のプロテオーム解析結果（ミトコンドリア関連蛋白の低下）から、発現変化が有意にみられた各蛋白（ATP5I、ATP synthase subunit g、Mitochondrial fission 1 protein）についてヒトの低出生性体重関連腎症症例で検討を試みる。また bioinformataics 解析にてこれらの変化の上流の pathway につき検討を行う。

4．研究成果

当初、既報に従い（PLoS One 10:e0118586; 2015）、妊娠 10 日以降から離乳期まで食餌量を 50%に制限し低出生体重個体作成を行う予定であったが、予想に反し、低出生体重個体を充分得られなかった。そこで、食餌制限による低出生体重ラット作成の条件検討を改めて行うこととなった、食餌量を 75%、45%、30%にし条件検討を行い、45%において低出生体重個体を高い確率で得られつつ、さらに出産直後の死亡も少ない（30%量では死産が多い）ことがわかった。また、以前の検討では腎皮質から蛋白を抽出しプロテオーム解析を行ったが、その結果がどの細胞での変化化を知るには困難であったため、今回は単離系球体、ならびにそこから培養したポドサイトを用い Omics 解析をすることとし、十分な組織病理解析とトランスクリプトームならびにエピジェネティクス解析を行いうる条件の検討も行った。現在、トランスクリプトーム解析中であり、研究期間内には十分な結果は得られなかったが、引き続き検討を進め、発現変化の大きい遺伝子については、当該遺伝子プロモーター領域のエピジェネティクス解析を行っていく。

プロテオーム解析結果（右図等）をもとに、特に顕著に減少していたミトコンドリア酸化的リン酸化経路複合体構成蛋白について、各種抗体を



を用い、ヒトの低出生体重関連腎症の組織染色を行った。現在のところ、その中でも ATP5I は尿細管での発現が認められること、そしてプロテオーム解析結果と同様に、低出生体重腎で発現が減少していることが分かってきた。なぜ、尿細管での発現低下が低出生体重関連腎症に特徴づけられる巣状分節性糸球体硬化症の発症と関与するのかについては明らかにできていない。ミトコンドリア機能の低下とともに解糖系も低下していることも示された。そこで解糖系蛋白の pyruvate kinase の染色も加えた。Pyruvate kinase については高血糖においたポドサイトでは逆に発現が増加することも、別実験で分かっていたので、

低出生体重関連腎症とともに糖尿病性腎症症例の腎生検体についても染色を試みた。その結果、低出生体重関連腎症での発現変化は認められなかったが、糖尿病性腎症では pyruvate kinase の発現がポドサイトで増強することが示され報告した (Imasawa T et.al.FASEB J 2017)。さらに IPA 解析にて、これらの蛋白の発現変化の上流には mTOR 系が関与することも分かってきた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Imasawa T, Obre E, Bellance N, Lavie J, Imasawa T, Rigotherier C, Delmas Y, Combe C, Lacombe D, Benard G, Claverol S, Bonneu M, Rossignol R

High glucose repatterns human podocyte energy metabolism during differentiation and diabetic nephropathy. FASEB J. 2017; 31: 294-307

〔学会発表〕(計 1 件)

Toshiyuki Imasawa¹, Emilie Obre², Takehiko Kawaguchi, Mari Okajima, Masaki Uehara, Eri Okada, Satoshi Kumakura, Moritoshi Kadomura, Rodrigue Rossignol²

Metabolic remodeling of podocytes in hyperglycemia

2017 ISN World Congress of Nephrology

April 21-25, 2015 (Mexico city, Mexico)

〔図書〕(計 3 件)

今澤俊之：遺伝学的検査：ミトコンドリア異常症

「腎と透析」ベッドサイド検査事典 (編集：腎と透析編集委員会)

2018 年 5 月発行

今澤俊之：ミトコンドリア異常症 腎臓専門医の視点：全身性疾患と腎
uptodate (編集：腎と透析編集委員会)(東京医学社) 印刷中

今澤俊之：遺伝学的検査：ミトコンドリア異常症

「腎と透析」ベッドサイド検査事典 (編集：腎と透析編集委員会) 2018 年 5 月発行

今澤俊之

「ミトコンドリア」: 特集 腎と糖尿病: 変革期の診断と治療

腎と透析(東京医学社)第84巻 No2 増刊号 p161-165 2018年2月25日発行

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：山口裕

ローマ字氏名：Yamaguchi Yutaka

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。