

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591286

研究課題名(和文)

母体低栄養、ステロイド投与のネフロン形成への影響およびそのメカニズムの解明

研究課題名(英文)

The effects of maternal undernutrition and glucocorticoid on nephrogenesis

研究代表者

粟津 緑 (AWAZU MIDORI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20129315

研究成果の概要(和文):

母体低栄養ラットの腎サイズ、尿管芽分岐は胎生 14 日以降減少する。腎サイズは生後正常となるがネフロン数は減少している。母体低栄養腎において腎発生に重要なシグナル分子は胎生 15 日には抑制、胎生 18 日には活性化されていた。一方、アポトーシスの指標、活性型カスパーゼ 3 は両時期ともに母体低栄養腎で減少していた。カスパーゼ 3 阻害は尿管芽細胞の運動を抑制した。母体低栄養腎のネフロン数減少はカスパーゼ 3 を介する細胞運動の低下により尿管芽分岐が抑制されるためと推測される。

研究成果の概要(英文):

Metanephros size and ureteric bud branching are decreased after embryonic day 14 by maternal nutrient restriction. Kidney size becomes normal after birth, whereas nephron number remains decreased. Signaling molecules important for kidney development are suppressed and activated at embryonic day 15 and 18, respectively. Cleaved caspase 3, a marker of apoptosis, was decreased at both time points. Inhibition of caspase 3 suppressed ureteric bud cell migration and cord formation. Low nephron number by maternal nutrient restriction results from inhibited ureteric branching that may be ascribed to the suppressed caspase 3 activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：母体低栄養、シグナル伝達、ネフロン数、プログラミング、腎発生、MAP キナーゼ、尿管芽、カスパーゼ 3

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) は末期腎不全のみならず心血管疾患の強力な危険因子であることが明らかになり、現在世界的規模で対策が講じられている。一方、高血圧、糖尿病、肥満、高脂血症、心血管疾患などの発症が胎児期、周産期のイベントに影響されること (プログラミング) が知られている。これは低出生体重児は成人期におけるこれらの疾患のリスクが高いという Barker の疫学的研究に端を発する。近年 CKD の発症にも同様の機構があることが明らかになった。Brenner は高血圧、CKD の発症機序としてネフロン数減少説を提唱しており、その根拠の一つは低出生体重児におけるネフロン数減少である。

ネフロン数は腎臓 1 個あたり 25 万から 200 万個の個人差があり、人種、性別、出生体重、在胎週数により異なる。子宮内発育遅延 (IUGR) による低出生体重児においてネフロン数減少が著しい。ネフロン数減少は腎容積の減少を伴うこともある。低出生体重児の成長後の糸球体濾過量は低く、尿中アルブミン排泄は多い。また低出生体重は腎疾患の発症、重症化のリスクを増加させる。1 型糖尿病性腎症の発症は出生体重が低いと多い。腎機能低下のオッズ比は原因疾患にかかわらず出生体重が低いほど高くなる。また低出生体重が糖尿病性腎症、IgA 腎症、膜性腎症、腎盂腎炎の予後不良因子であることも示唆されている。実験動物においては母体低栄養、蛋白制限および母体ステロイド投与がネフロン数を減少させる (ステロイドは肺の成熟を促進するため母体にしばしば投与され、また母体コルチゾールを不活化する 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II は IUGR 児の胎盤で減少しており胎児はステロイドに暴露される)。母体ステロイド投与は出生体重、腎重量には影響せずネフロン形成を阻害する。これらの病態におけるネフロン数減少機序の詳細は明らかになっていない。母体蛋白制限モデルにおいて胎仔腎内レニン、アンジオテンシン II の減少、胎生 13 日における後腎間葉細胞のアポトーシスの増加が報告されているのみである。ネフロンは後腎間葉と尿管芽の相互誘導により形成されるが、尿管芽分岐への影響は検討されていない。また低出生体重児ではネフロン数のみでなく、糸球体の構造が異常である可能性がある。アルブミン尿、腎疾患発症、重症化の機序として糸球体係蹄壁バリア機能を担う糸球体臓側上皮細胞 (ポドサイト) の障害が示唆される。またヒト低出生体重児において尿中 Ca、リン排泄増加が報告されており、尿細管の異常も示唆される。母体蛋白制限ラット腎における生後 8 週の糸球体、尿細管のアポトーシス、18 カ月時の糸球体硬化、尿細管萎縮、間質の線維化の報告はこれを支持する。

世界的に低出生体重児は増加しており、日本においても全出生の約 10% が低出生体重児である。将来の生活習慣病、CKD の増加が懸念される状況において、胎内環境のネフロン形成への影響、そのメカニズムの解明および予防、治療法の確立は急務である。

申請者は腎臓の発生過程において細胞内シグナル伝達の中核的酵素 MAP キナーゼが重要な役割を担うことを明らかにした (Kidney Int, 2000)。すなわち MAP キナーゼのサブタイプ extracellular signal-regulated kinase (ERK) および p38 MAP キナーゼ (p38) は幼若腎に強く、c-Jun N-terminal kinase (JNK) は成熟腎に発現する。また ERK 阻害によりネフロン形成が、p38 阻害によりネフロン形成、腎成長が抑制される (Kidney Int, 2002)。胎生 16 日以降の後腎においては ERK、p38 阻害は尿管芽分岐に影響せず、後腎間葉への直接作用によりネフロン形成を抑制する。一方、より早期の後腎においては ERK 阻害が尿管芽分岐を抑制することが Fisher らにより報告されている。

申請者は母体低栄養、ステロイド投与ラット胎仔腎の DNA アレイ解析を行い、変化する遺伝子群を同定した。母体低栄養、ステロイド投与ラット胎仔腎に共通して変化する遺伝子の中で受容体型チロシンフォスファターゼ (RPTP)、Neutrophil gelatinase associated lipocalin (Ngal)、peroxisome proliferators activated receptor (PPAR) をネフロン形成不全に関与する候補とし検討予定である。申請者は過去に RPTP を p38 阻害により発現が低下する遺伝子の一つとして同定している (J Am Soc Nephrol, 2003)。RPTP はチロシンリン酸化を脱リン酸化により調節する酵素であるが、細胞外ドメインに免疫グロブリン様構造を持ち、homophilic 結合により細胞接着にも関与する。p38 を阻害した後腎では後腎間葉細胞の尿管芽先端への凝集が見られないことから p38 は RPTP を介しネフロン形成を誘導する可能性が考えられる。RPTP は胎生期に強く発現し、後腎間葉に局在することを既に確認している (J Am Soc Nephrol 2004)。また、ERK が RPTP の下流シグナルであることが神経組織で報告されている。一方、Ngal は尿管芽から分泌され間葉上皮転換を誘導する因子として同定され、ERK 依存性に働くことが報告されている。細胞の鉄輸送も担う分子である。母体低栄養、ステロイド投与により発現が低下しておりネフロン形成不全への関与が考えられる。PPAR は発生の初期から組織特異性なく発現する蛋白で、ノックアウトマウスは胎盤発育不全を呈し、胎生致死となる。プロスタグランジン I₂、A₁ が PPAR を活性化するが生理的リガンドは不明である。PPAR は種々の臓器においてメタボリ

ック症候群改善の方向に働き心筋線維化を抑制するが、腎臓における作用は未知である。母体低栄養、ステロイドにより発現が増加しており、PPAR のリガンド低下に対するフィードバック機構、すなわち PPAR が腎発生へ影響していると推測される。PPAR は ERK、p38 によりリン酸化され活性が制御されることが知られている。また母体低栄養、ステロイド投与ラット胎仔腎の DNA アレイ解析では多数のトランスポーター遺伝子 (aquaporin2, clcnKb, Bartin 他) の発現低下がみられた。糸球体のみならず尿細管の異常を支持するデータである。

CKD、高血圧の原因となるプログラミングの機序としてエピジェネティクスが示唆されている。エピジェネティクスとは DNA の配列変化ではなく、DNA や染色体上の化学修飾の変化により細胞世代を越えて維持される遺伝子発現記憶機構の一つである。そのメカニズムには DNA メチル化、ヒストン修飾、クロマチンリモデリング、テロメア維持などがある。ネフロン形成不全は形態異常であるが、その原因となる機構は継承される可能性がある。実際、母体蛋白制限ラットが生後 catch up growth すると腎のテロメア長が短くなることが報告されている。また母体蛋白制限モデルにおいてアンジオテンシン受容体 1b の発現が増加し、その遺伝子のプロモーター領域がメチル化されていることが示された。一方、母体子宮動脈結紮による IUGR ラット新生仔に代理母による授乳を行うとネフロン数減少が回復することが報告され、生後の環境もネフロン形成に影響することが示された。ラットでは生後 10 日までネフロン形成が続くのでヒトに外挿することはできないが、ネフロン形成過程にある早期産児における治療の可能性を開く重要な事実である。

2. 研究の目的

- (1) 母体低栄養、ステロイド投与のネフロン形成への栄養の検討
 - 尿管芽、後腎間葉への影響
 - ERK、p38 の役割
 - ポドサイト、尿細管への影響
- (2) 母体低栄養、ステロイド投与におけるネフロン形成不全における RPTP、Ngal、PPAR の役割の検討
 - RPTP、Ngal、PPAR のネフロン形成における役割
 - 上記分子のシグナル伝達における ERK、p38 の役割
- (3) 母体低栄養、ステロイド投与によるネフロン形成不全におけるエピジェネティクスの検討
 - 環境による修飾
 - 継世代的影響

3. 研究の方法

母体低栄養ラットモデルは妊娠 1 日目より分娩まで対照の 50% に飼料を制限、胎生 13-18 日にサクリファイスし、後腎を摘出した。また生後経時的に新生仔腎を摘出した。それぞれウェスタンブロットまたは免疫組織染色により活性型および総 ERK、p38、PI3K/Akt、 β カテニン、PCNA、cleaved caspase 3 の発現を正常対照後腎と比較検討した。また尿管芽形成をホールマウント蛍光免疫組織染色 (DBA) により評価した。また後腎のサイズ測定、ホルマリン固定切片の Ki-67 染色、TUNEL 染色による増殖、アポトーシス、の評価を行った。培養尿管芽細胞 (Am J Physiol, 1997) を用い、細胞数計数により、アポトーシスを Hoechst33258 染色により、細胞遊走を Boyden chamber 法により、cord formation をコラーゲンゲル 3 次元培養により評価した。

4. 研究成果

(1) 母体低栄養ラットの腎臓

母体低栄養ラット胎仔 (NR) の体重、腎サイズは胎生 13 日では対照と同等であるが、胎生 14 日以降に減少する。胎生 18 日の NR のネフロン数は減少しており髄質は低形成であった。生後、腎サイズはキャッチアップし、生後 7 日には対照との有意差はなくなり生後 15 日には同等となる。しかし生後 4 週における NR のネフロン数は対照の 80% であった。

尿管芽先端数は胎生 13 日には NR も対照も 2 であったが、胎生 14 日以降、尿管芽分岐は対照の半数に減少した。糸球体が形成される nephrogenic zone は対照と同様に生後 12 日には消失し、糸球体の前駆細胞である cap mesenchyme のマーカー Cited 1 の発現も対照腎と同様に生後 3 日で消失した。したがって NR 腎では尿管芽分岐が抑制されているにもかかわらずネフロン形成終止時期は延長されないため、ネフロン数減少を来すと考えられた。また胎生 15 日には DNA/腎 (細胞数のマーカー)、蛋白/DNA (細胞サイズのマーカー) ともに有意差はなかったが、胎生 18 日には両者とも NR で対照に比し低値であり、NR 胎仔腎のサイズ減少は細胞数、細胞サイズ減少両者によることが明らかになった。

(2) 母体低栄養ラット腎におけるシグナル分子

予想に反し、胎生 18 日の NR における腎発生に重要なシグナル分子 (ERK、p38、PI3K、Akt、カテニン) のリン酸化活性型 (P-ERK、P-p38、P-PI3K、P-Akt) およびカテニン蛋白の発現は増加していた。これらの分子は胎生早期に活性化され成長に伴い活性が低下することから、原因として NR 腎の発達の遅れによる可能性を考えた。しかし対照、NR の

シグナル分子の発現の差は成長とともに減弱し生後7-15日には消失した。

第二に胎生18日におけるシグナル伝達系の活性化がそれ以前に生じた腎、ネフロン形成抑制に対する代償反応である可能性を考え、より早期の胎生15日において検討したところ、NRのP-ERK、P-p38、P-PI3K、P-Akt、

カテニン発現は減少していた。その結果生じる腎、ネフロン形成抑制に対し代償機構が働き胎生18日におけるシグナル伝達系の活性化が生じている可能性が示唆された。

(3)母体低栄養腎における caspase 3

母体低栄養胎仔腎で腎発生に重要なシグナル伝達経路は胎生15日には抑制、18日には活性化されているが、アポトーシスのマーカーとして評価した活性型 caspase 3は両時期ともに母体低栄養で発現が減少していた。Caspase 3 阻害薬下に培養された後腎は腎サイズ、尿管芽分岐が減少し、母体低栄養腎に類似することから、培養尿管芽細胞を用いた腎発生における caspase 3 の役割を検討した。Caspase 3 阻害薬は尿管芽細胞の cord formation、遊走を阻害したが、アポトーシス、細胞数には影響しなかった。Caspase 3 が細胞運動を介し尿管芽分岐を促進する可能性、また母体低栄養腎におけるネフロン数減少が caspase 3 活性の低下による可能性が考えられた。

以上、本研究は母体低栄養によるネフロン数減少機序が尿管芽分岐抑制であることを初めて明らかにした。また、従来、ネフロン数減少機序はアポトーシスによる細胞数減少であると考えられていたが、アポトーシスの最終実行分子である caspase 3 の活性は母体低栄養胎仔腎で逆に低下していた。近年、caspase 3 のアポトーシス以外の作用(細胞運動、分化、増殖)が他臓器で示されており、腎発生において caspase 3 は尿管芽細胞運動を介し尿管芽分岐を促進している可能性が考えられる。さらに母体低栄養における尿管芽分岐抑制が caspase 3 活性低下による可能性がある。今後の研究によりこれらの仮説が立証されれば新たな治療法の開発につながると考えられる。

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10件)

1. 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 2011 印刷中 査読なし
2. 粟津緑. 腎臓病の発生的起源. 体液研究会誌 2011 印刷中 査読なし
3. 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岐抑制機序の可能性-. 発達腎研究会誌 2011 印刷中 査読なし

4. Fujita H, Hida M, Kanemoto K, Fukuda K, Nagata M, Awazu M. Cyclic stretch induces proliferation and TGF- β 1-mediated apoptosis via p38 and ERK in ureteric bud cells. Am J Physiol Renal Physiol 299:F648-55, 2010 査読あり
5. 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 18:14-17, 2010 査読なし
6. 粟津緑. 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 2010:21-27, 2010 査読なし
7. 粟津緑. CAKUTの腎生理. 腎と透析 68:156-160, 2010 査読なし
8. 粟津緑, 飛弾麻里子. 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 17:25-29, 2009 査読なし
9. Omori S, Kitagawa H, Koike J, Fujita H, Hida M, Pringle KC, Awazu M. Activated extracellular signal-regulated kinase correlates with cyst formation and transforming growth factor- β expression in fetal obstructive uropathy. Kidney Int 73:1031-1037, 2008 査読あり
10. 粟津緑, 大森さゆ, 長田道夫, 飛弾麻里子. 後腎間葉細胞の増殖, Eカドヘリン発現, MAPキナーゼ活性に対するBMP7の濃度依存性効果. 発達腎研究会誌 16:39-42, 2008 査読なし

[学会発表](計28件)

1. 中澤美絵, 大橋祥子, 瀧川逸朗, 高橋弘剛, 本間英和, 北東功, 池田一成, 関根孝司, 粟津緑. Dent病様の尿細管機能障害を呈した超低出生体重児2例. 第114回日本小児科学会, 東京, 8月12日, 2011
2. Awazu M. Maternal nutrient restriction alters renal development. The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology, Fukuoka, June 3, 2011 (Invited speaker)
3. 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, Fukuoka, June 3, 2011
4. 粟津緑. 先天性腎尿路疾患におけるシグナル伝達異常. 第20回東海小児尿路疾患研究会, 名古屋, 3月5日, 2011 (招待講演)
5. Awazu M, Nagata M, Hida M. Caspase 3 Stimulates Migration And Cord Formation Of Ureteric Bud Cells: A Potential Role

- In Reduced Ureteric Bud Branching By Maternal Nutrient Restriction. Renal Week 2010, Denver, Nov, 2010 紙上発表
6. Hida M, Nagata M, Awazu M. Dysregulation Of mTOR Signaling Pathway In Rat Metanephros By Maternal Nutrient Restriction. Renal Week 2010, Denver, Nov, 2010 紙上発表
 7. 粟津緑. 腎発生におけるシグナル伝達. 第20回北海道小児腎臓病研究会, 札幌, 10月2日, 2010 (招待講演)
 8. 粟津緑. 発達腎臓学の見地から考える小児腎不全治療. 第32回日本小児腎不全学会, 札幌, 9月30日, 2010 (招待講演)
 9. 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岐抑制機序の可能性-. 第19回発達腎研究会, 東京, 9月19日, 2010
 10. Awazu M, Hida M. Inhibition of Branching Morphogenesis and Developmentally Regulated Signaling Pathways by Maternal Nutrient Restriction. The 15th Congress of the International Pediatric Nephrology Association, New York, Sep 1, 2010
 11. 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, 大阪, 7月2日, 2010
 12. Awazu M. MAP kinase in renal development. The 12th Asian Pacific Congress of Nephrology, Seoul, June 8, 2010 (Invited lecture)
 13. Awazu M. Low nephron number by maternal nutrient restriction. Seoul National University College of Medicine, Seoul, June 8, 2010 (Invited lecture)
 14. Awazu M, Hida M. Maternal nutrient restriction downregulates developmentally regulated signaling pathways in early rat kidney development. Renal Week 2009, San Diego, Nov 6, 2009
 15. Hida M, Awazu M. Effect of maternal dexamethasone treatment on fetal kidney protein expression. Renal Week 2009, San Diego, Nov 6, 2009
 16. 粟津緑. 閉塞性尿路腎症のシグナル伝達. 第18回日本小児泌尿器科学会, 淡路島, 9月30日, 2009 (招待講演)
 17. 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. 第18回発達腎研究会, 神戸, 9月6日, 2009
 18. 飛弾麻里子, 橋口明典, 粟津緑. 学校検尿を契機に見られた蛋白尿、軽度腎機能低下を呈する超低出生体重児例. 第44回日本小児腎臓病学会, 東京, 6月26日, 2009
 19. 杉井京子, 飛弾麻里子, 粟津緑. 多嚢胞性異形成腎症例における血圧、微量アルブミン尿、尿酸値の検討. 第44回日本小児腎臓病学会, 東京, 6月26日, 2009
 20. 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. 第52回日本腎臓学会, 横浜, 6月4日, 2009
 21. 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. 第52回日本腎臓学会, 横浜, 6月4日, 2009
 22. Awazu M, Hida M. Maternal nutrient restriction alters developmentally regulated signaling pathways in fetal rat kidney. World Congress of Nephrology, Milano, May 23, 2009
 23. Hida M, Nagata M, Awazu M. Leptin induces migration *via* ERK and p38 in a metanephric mesenchymal cell line. Renal Week 2008, Philadelphia, Nov 6, 2008
 24. Awazu M, Hida M. Maternal nutrient restriction activates developmentally regulated signaling pathways in fetal rat kidney. Renal Week 2008, Philadelphia, Nov 6, 2008
 25. 粟津緑, 飛弾麻里子. 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. 第17回発達腎研究会, 東京, 9月7日, 2008
 26. 飛弾麻里子, 大森さゆ, 長田道夫, 粟津緑. Leptin induces migration and epithelialization in a metanephric mesenchymal cell line. 第43回日本小児腎臓病学会, 6月14日, 2008
 27. 粟津緑. 腎発生におけるMAPキナーゼ -研究を通してわかった発達腎臓学の魅力-. 第43回日本小児腎臓病学会, 福岡, 6月13日, 2008 (招待講演)
 28. 粟津緑, 飛弾麻里子. 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. 第51回日本腎臓学会, 福岡, 6月1日, 2008
- [図書](計2件)
1. 粟津緑. 先天性腎尿路異常. 小児科学レビュー 監修 五十嵐隆. 総合医学社 p129-133, 2010
 2. Awazu M. Epidemiology of hypertension. In: Pediatric Nephrology. Avener, E.D., Harmon, W.E., Niaudet, P., and Yoshikawa, N. (eds.), Springer, Berlin H. pp. 1459-1484, 2009

6 . 研究組織

(1)研究代表者

粟津 緑 (AWAZU MIDORI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：23591584

(2)研究分担者

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

(3)連携研究者

なし