

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461620

研究課題名(和文) DNAメチル化制御によるネフロン数減少の治療の試み

研究課題名(英文) Prevention of low nephron number by modulation of DNA methylation

研究代表者

栗津 緑 (Awazu, Midori)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：20129315

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)：母体低栄養(NR)後腎ではDNAメチル化を担うDNA基転移酵素のうちDNMT1が減少しており、全般的DNAメチル化低下の一因と考えられた。また器官培養系でDNAメチル化を抑制すると尿管芽分岐、腎成長が抑制され、葉酸をNRラットに補給すると胎仔の尿管芽分岐、腎サイズ減少、糸球体密度、DNAメチル化低下が改善された。さらに器官培養系で葉酸を含むメチル基ドナー欠乏は尿管芽分岐、腎成長を抑制し、NR後腎を葉酸存在下で培養すると病態が改善された。以上からDNAメチル化は腎発生に必要であり、NR後腎の病態の一因はDNAメチル化低下であると考えられた。また葉酸によるネフロン数減少の予防の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In metanephroi from embryos of nutrient restricted rat dams, global DNA methylation is reduced, and the reduction in DNA methyltransferase 1, an enzyme that maintains DNA cytosine methylation, was thought to be the cause. DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine inhibited ureteric branching and metanephros growth in organ culture. On the other hand, folic acid supplementation to nutrient restricted mothers improved the reduction in ureteric branching, kidney size, glomerular density, and DNA methylation in the fetal kidney. Medium deficient in methyl donors including folic acid decreased ureteric branching and metanephros growth in organ culture, whereas the addition of folic acid to the medium improved the phenotype of metanephroi of fetuses from nutrient restricted mothers. Thus DNA methylation is necessary for kidney development and maternal folic acid supplementation may prevent low nephron number due to maternal nutrient restriction.

研究分野：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児腎・泌尿器学 ネフロン数 DNAメチレーション エピジェネティクス 母体低栄養 尿管芽分岐
DNAメチルトランスフェラーゼ 器官培養

1. 研究開始当初の背景

母体低栄養などの胎内劣悪環境により、慢性腎臓病発症の根底をなすネフロン数減少が生じる。研究代表者はラット母体低栄養胎仔腎におけるネフロン数減少の原因として1)尿管芽分岐抑制、2)全般的 DNA メチル化 (global DNA methylation) 低下、3)尿管芽分岐に關与する遺伝子の DNA メチル化の変化を見いだした。DNA メチル化低下は DNA メチル基転移酵素 (DNMT) の減少による可能性がある。DNMT3a および DNMT3b は新たにメチル基を導入し、DNMT1 は DNA 複製に伴ってそれを維持する。また DNMT が利用するメチル基源の生成経路には葉酸代謝が關与する。葉酸は低栄養母体に補給されると仔の高血圧発症を抑制することが知られている。

2. 研究の目的

本研究では母体低栄養による DNA メチル化の変化のメカニズムを明らかにするため、母体低栄養の DNA メチル化酵素への影響を検討する。また DNA メチル化阻害薬による DNA メチル化の抑制、葉酸による DNA メチル化増加により母体低栄養による尿管芽分岐・ネフロン数減少の治療を *ex vivo* 器官培養系、*in vivo* 実験系を用い試みる。さらに全般的および遺伝子特異的メチル化 (gene-specific methylation) を経時的に観察する。

3. 研究の方法

(1) 母体低栄養の DNA メチル化酵素への影響

DNMT1、DNMT3a、DNMT3b の発現を経時的に検討する。

(2) 母体低栄養胎仔腎への葉酸、DNA メチル化阻害薬の効果の検討 (*ex vivo* 後腎器官培養)

母体低栄養胎仔腎を葉酸、DNA メチル化阻害薬存在下、非存在下で器官培養し、尿管芽分岐数、腎サイズ、全般的 DNA メチル化への影響を検討する。対照胎仔腎を同様に培養し比較する。

(3) 母体低栄養ラットへの葉酸、DNA メチル化阻害薬の効果の検討 (*in vivo*)

栄養制限した母体ラットに葉酸または DNA メチル化阻害薬を投与し、胎仔腎の尿管芽分岐数、腎サイズ、DNA メチル化 (全般的、遺伝子特異的) を検討する。対照母体ラットに同様の処置を行い比較する。また生後のネフロン数を計数する。

(4) 遺伝子特異的メチル化の経時的検討

メチル化変化のみられた尿管芽分岐促進因子、抑制因子のメチル化をメチル化特

異的 PCR により経時的に評価する。

4. 研究成果

(1) DNMT1、3a、3b の母体低栄養腎 (NR) および対照腎における経時的発現

NR (E1 から出産まで 50%飼料制限) および対照ラット (CON) の胎生 15 日 (E15)、E18、生後 0 日 (P0)、P6、P14 の胎仔、新生仔腎における DNMT1、3a、3b の発現をウェスタンブロットで検討した。DNMT1 は CON、NR ともに経時的に発現が減少、P14 には消失した。DNMT3b は少なくとも P14 まで、DNMT3a は E15 におきのみ発現が認められた。E15 における NR の DNMT1 発現は CON に比し著明に減少していた。E15 における DNMT3a は両者で差がなく、DNMT3b は NR で増加していた。E18 以降には DNMT1、DNMT3b の NR、CON 間の差は認められなかった。

DNMT1 は正常腎発生過程において発現し、発達とともに減少する。NR 胎仔腎で発現が低下していることから、DNMT1 減少が NR の全般的 DNA メチル化低下、腎形成異常に關与している可能性がある。

(2) 正常後腎発生および母体低栄養後腎発生異常における DNA メチル化の役割の検討

器官培養系における DNA メチル化の阻害効果

5-aza-2'-deoxycytidine (Aza) 20 μ M 存在下、非存在下で 3 日間培養し尿管芽分岐を whole mount pancytokeratin 染色で、腎サイズを表面積で評価した。Aza 存在化で培養された後腎の尿管芽先端数は 3.0 ± 0.6 と対照 (8.2 ± 1.4) に比し有意に減少していた ($n=6$)。また腎表面積も Aza 存在下で減少し (1.39 ± 0.10 vs 3.51 ± 1.01 , $n=6$, $P < 0.005$)、NR 胎仔腎と類似していた。

メチル基ドナーである葉酸の母体低栄養ラットへの補給効果

低栄養母体への葉酸補給は尿管芽先端数、糸球体密度、後腎 DNA メチル化を増加させた。

葉酸の腎発生における効果 (*in vitro*)
葉酸欠乏培地で培養した後腎の尿管芽先端数、腎表面積は対照に比し有意に減少していた。

器官培養系におけるメチル基ドナー (葉酸、コリン、メチオニン) 欠乏培地の効果

メチル基ドナー欠乏培地で培養された後腎の尿管芽先端数、腎サイズは対照、葉酸欠乏培地で培養された後腎に比し有意に減少していた。メチル基ドナー培地に葉酸を補給

すると葉酸欠乏培地と同程度まで尿管芽先端数、腎サイズは回復した。

母体低栄養ラット腎への葉酸補給の効果 (ex vivo)

低栄養母体から摘出した後腎を通常培地または葉酸欠乏培地で培養したところ、葉酸の存在は尿管芽先端数、腎サイズを有意に増加させた。

DNA メチル化は腎発生に必要である。また葉酸を母体低栄養ラットに補給すると尿管芽分岐、糸球体密度、DNA メチル化が改善される。また母体低栄養腎を葉酸存在下で培養すると病態の改善がみられる。以上から母体低栄養後腎の病態の一因は DNA メチル化低下であると考えられた。

(3) DNA メチル化が変化していた遺伝子のうちその程度が大きくかつ腎発生上重要である遺伝子につき遺伝子特異的メチル化を検討した。

パイロシークエンス(ベータカテニン、PI3K サブユニット、Axin2)、パイサルファイトシークエンス(ベータカテニン)ではメチル化の変化を検出できなかった。MeDIP では対照と母体低栄養間の差を検出できていることから DNA ヒドロキシメチル化が変化している可能性が考えられた。

(4) DNA ヒドロキシメチル化の検討

ベータカテニンの DNA ヒドロキシメチル化が変化している可能性を考え 5hmC-seq を行った。しかし対照、母体低栄養腎いずれにもベータカテニン近傍にピークは認められなかった。一方、5hmC ピーク数は母体低栄養で 169 と対照 582 に比し低下していた。これらのピーク近傍にあり腎発生に関与する遺伝子で対照と母体低栄養間で差があったのは Amph1、Gluc1i、Gli3、IGFBP3、Cdh11、FGF10、Ihh、Agtr1a (対照のみ 5hmC 化)、Edn2、Fst (母体低栄養のみ 5hmC 化)であった。Amph1、Cdh11 は mRNA、蛋白レベルでも差が認められた。Agtr1a の mRNA は差がなかった。一方、全般的 DNA ヒドロキシメチル化は母体低栄養後腎で増加していた。

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 16 件)

1. Asada N, Tsukahara T, Furuhashi M, Noda S, Naganum K, Hashiguchi A, Awazu M:

Polycythemia, capillary rarefaction, and focal glomerulosclerosis in two adolescents born extremely low birth weight and premature. *Pediatric Nephrology*, 査読有 32:2017、1275-1278. DOI:10.1007/s00467-017-3654-z

2. Awazu M, Arai M, Ohashi S, Takahashi H, Sekine T, Ikeda K: Tubular dysfunction mimicking Dent's disease in 2 infants born with extremely low birth weight. *Case Report in Nephrology and Dialysis*, 査読有 7:2017、13-17. DOI:10.1159/000455828

3. 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 Reports*, 査読有 2017、DOI:10.1007/s13730-017-0250-9

4. Awazu M: Mitogen-activated protein kinases in the development of normal and diseased kidneys. *Childhood Kidney Diseases*, 査読有 21:2017、1-7 DOI.org/10.3339/jkspn.2017.21.1.1

5. 粟津緑: 腎臓病への DOHaD の影響 尿管・間質、血管. *小児内科*, 査読なし 49:2017、493-496

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*, 査読なし 25:2017、30-33.

8. 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* 査読なし 24:2016、9-12

9. Awazu M, Hida M: Maternal nutrient restriction inhibits ureteric bud branching but does not affect the duration of nephrogenesis in rats. *Pediatric Research*, 査読有 77:2015、633-639, DOI.10.1038/pr.2015.24.

10. Takenouchi T, Awazu M, Eggermann T, Kosaki K: Adult phenotype of Russell-Silver syndrome: A molecular support for Barker-Brenner's theory. *Congenital Anomaly (Kyoto)*, 査読有 55:2015、167-169, DOI.10.1111/cga.12105.

11. Yoshimura-Furuhashi M, Nishimura-Tadaki A, Amano Y, Ehara T, Hamasaki Y,

Muramatsu M, Shishido S, Aikawa A, Hamada R, Ishikura K, Hataya H, Hidaka Y, Noda S, Koike K, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Awazu M, Miyake N, Kosho T: Renal complications in 6p duplication syndrome: microarray-based investigation of the candidate gene(s) for the development of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) and focal segmental glomerular sclerosis (FSGS). Am J Med Genet A, 査読有 167A:2015、592-601 DOI.

10.1002/ajmg.a.36942.

12. 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メチル化. 発達腎研究会誌 査読なし 23:2015、8-10
13. 飛弾麻里子、粟津緑: 母体低栄養ラットモデルにおける胎仔後腎 DNA メチル化の網羅的検討. 発達腎研究会誌 査読なし 22:2014、18-21
14. 粟津緑: 低栄養ラットモデルと腎発生への影響. 小児外科 査読なし 46:2014、650-653
15. 粟津緑: DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 仮説. 小児科診療 査読なし 77:2014、785-790
16. 粟津緑: 腎発生からみた branching morphogenesis. 日本小児腎臓病学会雑誌 査読有 27:2014、19-27

[学会発表](計 24 件)

1. Asada N, Tsukahara T, Matsuoka D, Furuhashi M, Noda S, Naganuma K, Hashiguchi A, Awazu M: Polycythemia and peritubular capillary rarefaction in two adolescents born prematurely with extremely low birth weight. Kidney Week 2016(国際学会), 11月17日~11月20日、2016、シカゴ(アメリカ)
2. Hida M, Abe T, Hashiguchi A, Awazu M: Maternal nutrient restriction aggravates renal tubular necrosis and interstitial fibrosis after unilateral ureteral obstruction in rat offspring. Kidney Week 2016(国際学会)、11月17日~11月20日、2016、シカゴ(アメリカ)
3. Awazu M, Yamaguchi Y, Miura M, Hida M: Caspase-3 mediates inhibition of ureteric branching and nephrogenesis by maternal nutrient restriction in mice. Kidney Week 2016(国際学会)、11月17

日~11月20日、2016、シカゴ(アメリカ)

4. 粟津緑: 極・超低出生体重児のCKD. 第25回長野県小児腎臓病研究会(招待講演) 11月12日、2016、ホテルブエナビスタ(長野県松本市)
5. Awazu M: Application of ABP monitoring in the management of pediatric hypertension. The 26th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension(招待講演)(国際学会)9月24日~9月29日、2016、ソウル(韓国)
6. 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. 第25回発達腎研究会、8月28日~8月29日、2016、聖路加病院(東京都中央区)
7. 粟津緑、山口良文、三浦正幸、飛弾麻里子: 母体低栄養マウスにおける尿管芽分岐・ネフロン数減少はcaspase-3活性低下による. 第51回日本小児腎臓病学会 7月7日~7月9日、2016、ウインクあいち(愛知県名古屋市)
8. 粟津緑、飛弾麻里子: 葉酸は母体低栄養、メチル基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51回日本小児腎臓病学会 7月7日~7月9日、2016、ウインクあいち(愛知県名古屋市)
9. 浅田礼光、塚原 孝典、松岡大輔、降籬めぐみ、長沼邦明、野田俊輔、橋口明典、粟津緑: 尿細管周囲毛細血管の菲薄化により多血症を呈したと考えられる超早産の2青年例. 第51回日本小児腎臓病学会 7月7日~7月9日、2016、ウインクあいち(愛知県名古屋市)
10. 飛弾麻里子、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増悪機序 -腎NO産生低下と酸化ストレス増加-. 第51回日本小児腎臓病学会 7月7日~7月9日、2016、ウインクあいち(愛知県名古屋市)
11. 粟津緑、飛弾麻里子: 葉酸は母体低栄養、メチル基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 6月17日~6月19日、2016、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
12. 浅田礼光、塚原 孝典、松岡 大輔、降籬めぐみ、野田 俊輔、橋口明典、粟津 緑: 尿細管周囲毛細血管の菲薄化により多血症を呈したと考えられる超早産の2青年例. 第119回日本小児科学会 5月13日~15日、2016、さっぽろ芸術文化の館(北海道札幌)

- 市)
13. Awazu M, Hida M: Folic acid alleviates reduced ureteric branching and nephrogenesis induced by maternal undernutrition in rat embryonic kidney. *Kidney Week 2015*, 11月5日~11月8日、2015、San Diego (アメリカ)
 14. Hida M, Abe T, Hashiguchi A, Awazu M: Maternal nutrient restriction aggravates renal tubular necrosis and interstitial fibrosis after unilateral ureteral obstruction in rat offspring. *Kidney Week 2015*, 11月5日~11月8日、2015、San Diego (アメリカ)
 15. 粟津緑: 腎臓病の根源を探る-母体低栄養モデルを用いて-. 第65回東海小児腎臓病談話会. (招待講演) 10月17日、2015、ノバルティスファーマ名古屋事業所(愛知県名古屋市)
 16. 粟津緑: 生活習慣病発症リスクとしての胎生期栄養環境~予防的介入は可能か? 第6回北海道W.I.N.学術講演会(招待講演) 10月10日、2015、ACU アスティ45 (北海道札幌市)
 17. 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45回日本腎臓学会東部学術大会.(招待講演)10月2日、2015、東京ミッドタウン(東京都港区)
 18. 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 6月18日~6月20日、2015、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
 19. 粟津緑、阿部時也、橋口明典、飛弾麻里子: 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 6月18日~6月20日、2015、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
 20. 粟津緑、飛弾麻里子: DNAメチルトランスフェラーゼ1はラット後腎発生に必要であり母体低栄養腎で減少する. 第58回日本腎臓学会 6月5日~6月7日、2015、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
 21. Awazu M, Hida M: DNA methyltransferase 1 is required for rat metanephric development and its abundance is reduced by maternal nutrient restriction. *Kidney Week 2014*, 11月13日~16日、2014、Philadelphia (アメリカ)
 22. 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メチル化. 第57回日本腎臓学会 7月4日~7月6日、2014、パシフィコ横浜(神奈川県横浜)

23. 粟津緑、飛弾麻里子: 母体低栄養ラット胎仔腎におけるDNAメチル化の網羅的解析. 第49回日本小児腎臓病学会 6月5日~6月7日、2014、秋田ビューホテル(秋田県秋田市)
24. 粟津緑: Low nephron number. 第49回日本小児腎臓病学会(招待講演) 6月5日~6月7日、2014、秋田ビューホテル(秋田県秋田市)

〔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0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

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: 20129315

(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()

研究者番号:

(4)研究協力者
なし()