

Title	子宮内劣悪環境に起因する尿細管機能障害の検討
Sub Title	Unsuitable in-utero environment decrease renal tubular function of fetus.
Author	飛弾, 麻里子(Hida, Mariko) 粟津, 緑(Awazu, Midori)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014.)
Abstract	<p>超低出生体重児53名の25.5%に糸球体障害を, 82.6%に尿細管障害を認め, 出生体重との相関を確認した。続いて母胎低栄養ラット(NR)胎仔後腎において尿管芽分枝と糸球体数の減少を, その原因として尿管芽分枝に関与する遺伝子のメチル化の変化を認めた。さらに成熟後のNRラット仔が, 片側尿管結紮により尿細管壊死を伴う腎障害を呈すことを確認した。</p> <p>子宮内劣悪環境を経た超低出生体重児の腎機能障害, 特に尿細管障害についての報告は少なく, 本成果はその原因が胎児プログラミングにあり, また成長後の二次的侵襲の影響もより強く受けることを示した。今後, 新生児医療において腎機能障害に着目したフォローアップが必要である。</p> <p>The number of low birth weight babies, products of intra uterine growth retardation (IUGR), is increasing in Japan. Those IUGR survivors are known to develop metabolic syndrome in adult life due to probable reduced kidney function. We studied glomerular and tubular function of 53 extremely low birth weight subjects (ELBW). Twenty five percent of subjects had glomerular dysfunction and eighty three percent of them had tubular dysfunction. We showed that maternal nutritional restriction, NR, leads to reduced ureteric branching resulted in low nephron number of rat embryos. In those embryos, DNA methylation of genes involved in ureteric branching has been changed, which may contribute to reduced nephron number and transgenerational transmission. Further, we found the kidney of offsprings from NR rats were more susceptible to ischemia and fibrosis secondary to unilateral ureteral obstruction. The results have pointed out necessity of careful follow-up of kidney function for those premies.</p>
Notes	研究種目: 基盤研究(C) 研究期間: 2012 ~ 2014 課題番号: 24591610 研究分野: 胎児, 新生児学
Genre	Research Paper
URL	http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24591610seika

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591610

研究課題名(和文) 子宮内劣悪環境に起因する尿細管機能障害の検討

研究課題名(英文) Unsuitable in-utero environment decrease renal tubular function of fetus.

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

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)：超低出生体重児53名の25.5%に糸球体障害を、82.6%に尿細管障害を認め、出生体重との相関を確認した。続いて母胎低栄養ラット(NR)胎仔後腎において尿管芽分枝と糸球体数の減少を、その原因として尿管芽分枝に關与する遺伝子のメチル化の変化を認めた。さらに成熟後のNRラット仔が、片側尿管結紮により尿細管壊死を伴う腎障害を呈すことを確認した。

子宮内劣悪環境を経た超低出生体重児の腎機能障害、特に尿細管障害についての報告は少なく、本成果はその原因が胎児プログラミングにあり、また成長後の二次的侵襲の影響もより強く受けることを示した。今後、新生児医療において腎機能障害に着目したフォローアップが必要である。

研究成果の概要(英文)：The number of low birth weight babies, products of intra uterine growth retardation (IUGR), is increasing in Japan. Those IUGR survivors are known to develop metabolic syndrome in adult life due to probable reduced kidney function. We studied glomerular and tubular function of 53 extremely low birth weight subjects (ELBW). Twenty five percent of subjects had glomerular dysfunction and eighty three percent of them had tubular dysfunction. We showed that maternal nutritional restriction, NR, leads to reduced ureteric branching resulted in low nephron number of rat embryos. In those embryos, DNA methylation of genes involved in ureteric branching has been changed, which may contribute to reduced nephron number and transgenerational transmission. Further, we found the kidney of offsprings from NR rats were more susceptible to ischemia and fibrosis secondary to unilateral ureteral obstruction. The results have pointed out necessity of careful follow-up of kidney function for those premies.

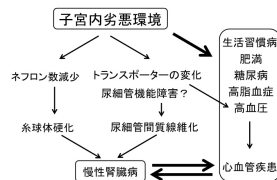
研究分野：胎児・新生児学

キーワード：胎児プログラミング 子宮内胎児発育遅滞 oligomeganephronia 生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

近年、疾病の発生機序として、プログラミング機構、すなわち胎生期、周産期のイベントが成長後の健康状態、疾患発症に影響を及ぼす現象の存在が報告されている。Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 仮説とも呼ばれ、その一つとして、低出生体重が生活習慣病およびその結果である心血管疾患発症の危険因子となることが疫学的に確認されている。低出生体重は子宮内劣悪環境(母体低栄養、糖尿病、高血圧、虚血)により生じる。低出生体重児では、糸球体濾過量低下、蛋白尿、二次性糸球体硬化が報告されており、慢性腎臓病(CKD)の発症、重症化のリスクが増加することが分かっている。また低出生体重によりネフローゼ症候群、IgA腎症、糖尿病性腎症、膜性腎症、慢性腎盂腎炎の予後が悪くなることが知られている。その原因はネフロン数減少と考えられており、高血圧、糸球体肥大と硬化、腎機能低下に至ることが動物実験、臨床研究により示されている。CKDは末期腎不全のみならず心血管疾患の独立した危険因子であり生活習慣病を高率に合併する。逆に生活習慣病はCKDの危険因子であり、両者の悪循環が形成されている。

子宮内劣悪環境によるCKD、生活習慣病発症機序を解明が両者を一元的に解決する方策となることを期待される。CKDの病態としては糸球体障害のみでなく尿細管病変、それに伴う間質線維化も重要である。尿細管のプログラミングに関する報告は少ない。ラット母体低蛋白モデルでは生後18か月における尿細管アポトーシス、間質線維化の報告がある。またウズラ低栄養モデルではアクアポリン2の発現が低下やNaトランスポーターBSC1とNa-Cl共輸送体の発現増加が報告されており高血圧の発症への関与が推測されている。ヒトにおいては超出生体重児の尿中Ca、リン排泄が亢進しているとの報告がある。以上から子宮内劣悪環境による影響は尿細管にも及び、CKD発症、重症化に関与すると推測される。本邦で出生する児の約10%は低出生体重であり、その数は増加傾向にある。低出生体重の原因となる子宮内劣悪環境のみでなく、肺の成熟を促すために母体に投与されるステロイド、出生後の低栄養、肺疾患、抗菌薬など新生時期の環境も腎障害を生じる可能性がある。しかしながら低出生体重児の尿細管機能障害に関するデータは尿中Ca、リン増加以外存在しない。尿細管障害を伴う症例は糸球体障害を合併もしくは糸球体障害に先行する可能性が高い。尿細管機能障害が腎障害の早期マーカーとなり得れば臨床的に極めて有用である。また子宮内



劣悪環境が尿細管・間質疾患の疾患感受性を増加させるとの仮説が立証されれば予防策を講じることができる。研究代表者のグループは腎発生におけるシグナル伝達の中核的酵素MAPキナーゼに着目し研究を進めてきた。これらの一連の研究は国際的な評価を受けている。近年は有病率が高く、医療経済的インパクトの大きいCKDの根底にあるネフロン数減少を研究の対象としてきた。本申請はそれを糸球体から尿細管まで発展させたものである。研究代表者は新生児医療に従事している。日本の新生児医療は「救命」から、「後障害なき生存」を目標に治療デザイン全体の見直しが行われているが、腎臓に対する対策は行われていない。将来的には尿細管機能障害のメカニズムを解明し治療法を開発することを目指す。

劣悪環境が尿細管・間質疾患の疾患感受性を増加させるとの仮説が立証されれば予防策を講じることができる。

研究代表者のグループは腎発生におけるシグナル伝達の中核的酵素MAPキナーゼに着目し研究を進めてきた。これらの一連の研究は国際的な評価を受けている。近年は有病率が高く、医療経済的インパクトの大きいCKDの根底にあるネフロン数減少を研究の対象としてきた。本申請はそれを糸球体から尿細管まで発展させたものである。研究代表者は新生児医療に従事している。日本の新生児医療は「救命」から、「後障害なき生存」を目標に治療デザイン全体の見直しが行われているが、腎臓に対する対策は行われていない。将来的には尿細管機能障害のメカニズムを解明し治療法を開発することを目指す。

2. 研究の目的

子宮内劣悪環境に起因する尿細管機能障害の検討

(1) 超低出生体重児の尿細管機能の経時的検討

(2) ラット母体低栄養、ステロイド投与モデルにおけるトランスポーターの発現、尿細管機能および尿細管・間質病変の検討

(3) ラット母体低栄養、ステロイド投与モデルに二次的侵襲(片側尿管結紮、虚血再還流)を加えた時の尿細管障害の検討

3. 研究の方法

・臨床研究：超低出生体重児の新生児期・乳幼児期から学童期にかけての尿細管機能を評価するためのデータ集積、解析を行う

・基礎研究：

母体低栄養モデル、ステロイド投与モデルの生後の尿細管機能の評価、経時的観察。水制限試験への反応の評価。経時的な腎・尿細管の形態学的観察、トランスポーターの遺伝子・蛋白発現を調べる。

同上モデルに二次的侵襲(片側尿管結紮、虚血再還流)を加え、血圧、糸球体機能(血清クレアチニン、UN)、尿細管機能、病理組織を検討した。

4. 研究成果

・臨床研究：「超低出生体重児の82.6%に尿細管機能異常を合併」

生後7か月以上のELBW児52名(男:女は30:22)を検討、検体採取時の歴年齢中央値2歳0か月。在胎週数平均値26.5週、出生体重平均値726g。尿細管機能は、尿中Ca/Cr(7-12か月>0.8、1-3歳>0.53、3-5歳>0.4、5-7歳>0.3、>7歳>0.2)、NAG/Cr(>5U/g)、

2マイクログロブリン(2m)(>200ug/L)、glucose/Cr(glu/Cr)(>100mg/g)を、糸球体障害の指標としてマイクロアルブミン(alb/Cr)>30mg/gを異常とした。82.6%に尿細管異常を、25.5%にアルブミン尿を認めた。尿細

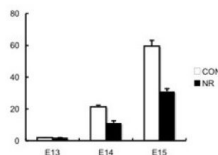
管異常の内訳は Ca/Cr 高値 37.2%、NAG/Cr 高値 71.7%、2m 高値 30.4%、glu/Cr 高値 91.3%。超音波で 34.6%に腎石灰化を認めた。在胎週数の平均値は 2m 高値群では 25.2 週(正常群 27.0 週)、alb/Cr 高値群では 24.8 週(正常群 26.8 週)と有意に短縮、また 2m 値は出生体重、在胎週数と有意に相関した。いずれの尿細管異常も alb/Cr とは相関を示さなかった。LBW 児に尿細管障害が高頻度にみられることが明らかになった。尿細管異常はアルブミン尿と相関せず、糸球体障害による二次性の障害ではなく、胎内、周生期の異常による一次的な障害であることが示唆され、一部の尿細管障害(2m)は出生体重との関連がみられた。

これらのマーカーは在胎週数との関連が強いことが更なる症例の集積で示唆された。さらに IUGR、EUGR、仮死、慢性肺疾患、ステロイド・抗菌薬投与、新生児期における腎不全の有無との関連も検討を行ったが、在胎週数以上に統計学的に有意な関連を示唆する因子は認められなかった。

超低出生体重児の後障害については、眼障害、運動精神発達遅滞、呼吸障害などの検討が重ねられているが、尿細管機能異常についてのデータは殆どなく、今後の新生児内科医療の治療方針および成長後のフォローアップ方針に影響を与えると考える。

基礎研究：「母体低栄養は胎仔後腎の尿管芽分枝に關する遺伝子の DNA メチル化に作用し、尿管芽分枝の減少、ネフロン数減少の原因となる可能性がある」「母体低栄養により胎仔腎は二次的な侵襲による障害がより強く出る」

母体低栄養の胎仔腎 DNA メチル化への影響を網羅的に検討した。母体低栄養(NR、胎生 1 日より対照の 50%に飼料を制限)および対照ラットの胎生 18 日後腎の DNA メチル化を MeDIP 法、NimbleGen Rat ChIP-chip 385K Promoter array を用い検討した。尿管芽は胎生 13、14、15、18 日の胎仔腎を pancytokeratin 染色で評価した。糸球体数は生後 3 週のラット腎を acid maceration 法により評価した。NR の胎生 13-15 日の尿管芽分岐は対照に比し 50%、生後 3 週の糸球体数は 20%減少していた。



DNA のメチル化については、15911 のプロモーター領域のうち 4827 領域が NR でのみメチル化されていた。メチル化が増加した領域の遺伝子の GO カテゴリーは頻度の高い順にシグナル伝達、転写、トランスポート、アポトーシス、発生、その他であった。腎発生に關する遺伝子でメチル化されていたものの大部分が尿管芽分岐に關するものであった。以上より、母体低栄養により尿管芽分岐に關する遺伝子の DNA メチル化が変化することが

示された。これはネフロン数減少、および継世代的伝達に關する可能性がある。低出生体重児のネフロン数減少については発生機序が未解明であるが、本研究の結果から尿管芽分枝数減少が原因の一つ出あることが示唆された。

・子宮内劣悪環境によるネフロン数、尿細管、間質、微小血管密度、血管内皮機能、酸化ストレス反応も影響への変化が二次的侵襲により顕性化するかを、成熟後の母体低栄養ラット仔に片側尿管結紮を行い検討した。体重、血圧、血清クレアチニン(Cr)、尿(浸透圧、蛋白/Cr、Na/Cr、NAG/Cr、Mg/Cr)に對照、NR 間の差はみられなかったが BUN は NR で有意に増加していた(20.8±0.8 vs 17.5±0.1 mg/dl)。病理学的には、對照、NR 閉塞腎ともに腎盂の拡張を認めたが、NR で、広範な尿細管壊死を伴っていた。collagen の専有面積は NR 閉塞腎(±%)と顯著に増加していた(對照 ±%)。CD31 染色性は NR と對照で差はなく、傍尿細管毛細管の希薄化が壊死に關する可能性は支持されなかった。NR 仔ラットは尿管結紮による腎傷害の程度が強く、虚血に対する脆弱性、線維化の亢進が示唆された。NR により一酸化窒素産生低下による血管収縮、酸化ストレスの増加が生じることが知られている。傍尿細管毛細管密度に差がないことから、これらが病態に關する可能性が考えられる。(尚、この部分の成果については、平成 27 年 6 月に行われる第 50 回日本小兒腎臟病学会学術集会で報告予定である。)

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 11 件)

Awazu M, Hida M. Maternal nutrient restriction inhibits ureteric bud branching but does not affect the duration of nephrogenesis in rats. *Pediatr Res.* 査読有り, 77, 2015, pp633-9. DOI: 10.1038/pr.2015.24.

Takenouchi T, Awazu M, Eggermann T, Kosaki K Adult Phenotype of Russell-Silver Syndrome: A Molecular Support for Barker-Brenner's Theory. *Congenit Anom (Kyoto).* 査読あり, 2015. doi: 10.1111/cga.12105.

飛彈 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.* 査読無し, 22 巻, 2014 年, pp18-21

粟津 緑. 【病態解析のための動物モデル-何がわかったか】低栄養ラットモデルと腎発生への影響. *小兒外科.* 査読無し, 46 巻, 2014 年, pp650-653

粟津 緑、腎発生からみた branching morphogenesis、日本小児腎臓病学会雑誌、査読有り、2014年、pp19-22
 粟津 緑、山口 良文、長田 道夫、三浦正幸、飛弾 麻里子、Caspase-3はWnt11により活性化され Rho-associated protein kinase 1、catenin を介し尿管芽分岐を誘導する。発達腎研究会誌、査読無し、2014年、pp12-14
 粟津 緑、【DOHaD アップデート-胎生期から乳児期までの環境と成人期の健康・疾患】腎疾患と DOHaD、産科と婦人科、査読無し、80 巻、2013 年、pp605-609
 粟津緑、山口良文、三浦正幸、飛弾麻里子、Caspase-3 ノックアウトマウスにおけるネフロン数、血圧、腎機能の検討、発達腎研究会誌、査読無し、20 巻、2012 年、pp13-15
 Takenouchi T, Hida M, Sakamoto Y, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Kosaki K. Severe congenital lipodystrophy and a progeroid appearance: Mutation in the penultimate exon of FBN1 causing a recognizable phenotype. *Am J Med Genet A*. 査読有り, 2013, 161A(12):pp3057-62. DOI: 10.1002/ajmg.a.36157.

〔学会発表〕(計 16 件)

粟津緑 Low nephron number. 第 49 回日本小児腎臓病学会、2014 年 6 月 5 日～9 日、秋田市、秋田ビューホテル
Midori Awazu, Mariko Hida. DNA methyltransferase 1 is required for rat metanephric development and its abundance is reduced by maternal nutrient restriction. *American Society of Nephrology, Kidney Week* 2014. 2014 年 11 月 1 日～6 日, Philadelphia, USA
 飛弾麻里子 母体低栄養のラット後腎 DNA メチル化への影響、第 58 回日本人類遺伝学会学術集会、2013 年 11 月 20 日、仙台、江陽グランドホテル
 飛弾麻里子、粟津緑、母体低栄養のラット後腎 DNA メチル化への影響、第 56 回日本腎臓学会学術集会、2013 年 5 月 12 日、東京、東京国際フォーラム
Mariko Hida, Midori Awazu. Maternal undernutrition alters DNA methylation profiles in rat embryonic kidney. *DOHaD* 2013, 2013 年 11 月 17 日、シンガポール
Midori Awazu, Mariko Hida. Global and Gene-specific hypomethylation by maternal undernutrition in rat embryonic kidney. *American Society of Nephrology, Kidney Week* 2013. 2013

年 11 月 5 日～11 月 13 日, Atlanta, USA
 Kazuya Mtsamura, Midori Awazu. Tubular dysfunction in extremely low birth weight survivors. *American Society of Nephrology, Kidney Week* 2013. 2013 年 11 月 5 日～11 月 13 日, Atlanta, USA
Mariko Hida, Midori Awazu, Maternal Undernutrition Alters DNA Methylation Profiles in Rat Embryonic Kidney. *American Society of Nephrology, Kidney Week* 2012. 2012 年 10 月 30 日～11 月 06 日, San Diego, USA
Midori Awazu, Yoshifumi Yamaguchi, Michio Nagata, Masayuki Miura, Mariko Hida, Caspase-3 Acts Downstream of Wnt11 and Stimulates Branching Morphogenesis by Activating Rho-Associated Protein Kinase 1 and Inhibiting Catenin Signaling. *American Society of Nephrology, Kidney Week* 2012. 2012 年 10 月 30 日～11 月 06 日, San Diego, USA
 松村和哉、飛弾麻里子、松崎陽平、池田一成、粟津 緑。超低出生体重児における尿細管機能の検討、第 47 回日本小児腎臓病学会学術集会、2012 年 06 月 29 日～30 日、東京、京王プラザホテル
 粟津緑、山口良文、三浦正幸、飛弾麻里子、Caspase-3 ノックアウトマウスはネフロン数が減少しているにもかかわらず高い腎機能を有する、第 47 回日本小児腎臓病学会学術集会、2012 年 06 月 29 日～30 日、東京、京王プラザホテル
Mariko Hida, Akinori Hashiguchi, Kenjiro Kosaki, and Midori Awazu. A case of secondary FSGS in a 19-year old male with Russell-Silver Syndrome. 第 10 回日韓小児腎セミナー、2012 年 05 月 11 日～12 日、東京、日本大学駿河台病院
 飛弾 麻里子、酒井 智子、松井 美優、島袋 林秀、城 裕之、新生児腎機能評価極低出生体重児における尿素窒素部分排泄率(FEUN)の検討、第 115 回日本小児科学会学術集会、2012 年 04 月 20 日～22 日、福岡、福岡国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
 出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
 なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

飛彈 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

栗津 緑 (AWAZU, MIDORI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：20129315