慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	子宮内胎仔発育遅延モデルにおけるネフロン数減少機序解明とその治療法の開発
Sub Title	Mechanism of impaired nephrogeneis in intrauterine growth retardation and development of treatment strategies.
Author	粟津, 緑(Awazu, Midori) 飛彈, 麻里子(Hida, Mariko)
Publisher	
Publication year	2014
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2013.)
JaLC DOI	
Abstract	慢性腎臓病の発症はネフロン数に左右される。私達はネフロン数決定要因である尿管芽分岐に関与する分子の研究を行いcaspase-3という酵素が重要であることを見いだした。Caspase-3の下流にある分子b- cateninを活性化する薬物療法を母体低栄養ラットに試みたが副作用のため不成功であった。 新たなネフロン数増加のアプローチとして胎内の栄養により遺伝子の発現が変化する機構の一つDNAメチル化を調べた。母体低栄養によりDNAメチル化が変化している腎発生関連の遺伝子のほとんどが尿管芽分岐に関与していた。DNAメチル化修飾によりネフロン数を増やす治療法が可能かもしれない。 Low nephron number increases the risk of chronic kidney disease. Nephron number is determined by intrauterine environment. We studied the mechanisms of low nephron number and reduced ureteric bud branching by maternal nutrient restriction in rats, and found that caspase-3, a cysteine protease, is playing an important role. We attempted to increase nephron number by giving lithium, an agent to activate b-catenin, a molecule downstream of caspase-3. Due to toxicity, however, this approach turned out to be unsuccessful. We investigated the effects of maternal nutrient restriction on genome-wide DNA methylation in rat embryonic kidney. Methylated genes by nutrient restriction important in kidney development are mostly those critical for ureteric branching. Targeting DNA methylation could lead to a new therapeutic strategy.
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2011～2013 課題番号：23591584 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
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_23591584seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ５ 月 ２４ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2011～2013
課題番号：２３５９１５８４

研究課題名（和文）子宮内胎仔発育遅延モデルにおけるネフロン数減少機序解明とその治療法の開発

研究課題名（英文）Mechanism of impaired nephrogeneis in intrauterine growth retardation and development of treatment strategies.

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　4,100,000円、（間接経費）　1,230,000円

研究成果の概要（和文）：慢性腎臓病の発症はネフロン数に左右される。私達はネフロン数決定要因である尿管芽分岐に関与する分子の研究を行いcaspase-3という酵素が重要であることを見いだした。Caspase-3の下流にある分子b-cateninを活性化する薬物療法を母体低栄養ラットに試みたが副作用のため不成功であった。
　新たなネフロン数増加のアプローチとして胎内の栄養により遺伝子の発現が変化する機構の一つDNAメチル化を調べた。母体低栄養によりDNAメチル化が変化している腎発生関連の遺伝子のほとんどが尿管芽分岐に関与していた。DNAメチル化修飾によりネフロン数を増やす治療法が可能かもしれない。

研究成果の概要（英文）：Low nephron number increases the risk of chronic kidney disease. Nephron number is determined by intrauterine environment. We studied the mechanisms of low nephron number and reduced ureteric bud branching by maternal nutrient restriction in rats, and found that caspase-3, a cysteine protease, is playing an important role. We attempted to increase nephron number by giving lithium, an agent to activate b-catenin, a molecule downstream of caspase-3. Due to toxicity, however, this approach turned out to be unsuccessful.
　We investigated the effects of maternal nutrient restriction on genome-wide DNA methylation in rat embryonic kidney. Methylated genes by nutrient restriction important in kidney development are mostly those critical for ureteric branching. Targeting DNA methylation could lead to a new therapeutic strategy.

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：小児腎・泌尿器学

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。高血圧、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、早産により減少する。動物においては母体低栄養、低蛋白および母体ステロイド投与がネフロン数を減少させる。母体低蛋白モデルにおいて報告されている後腎間葉細胞のアポトーシスの増加がネフロン数減少機序の通説となっている。一方、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、研究代表者は、母体低栄養ラット胎仔腎において尿管芽分岐が抑制されていることを見出した。また同モデル胎仔腎の DNA アレイ解析において多数のシグナル分子の遺伝子が変化していたことから腎発生に重要な役割を担うシグナル伝達経路 ERK、p38、PI3K/Akt、β-catenin の活性、発現を検討した。これらは胎生 15 日では減少していた。一方、アポトーシスの指標として評価した cleaved caspase-3[アポトーシスの最終段階を媒介する酵素 caspase-3 (Casp3)の活性型]の発現は低下していた。母体ステロイド投与胎仔後腎においても同じく低下していた。これはネフロン数の減少機序としてアポトーシスが重要であるという過去の報告と矛盾する。Casp3 阻害薬存在下で培養された後腎の腎成長、尿管芽分岐は抑制されることが知られているがその機序は不明である。近年 caspase がアポトーシスのみでなく細胞増殖、分化、運動に関与することが明らかになっておりこれらの作用が尿管芽分岐、腎成長に必要である可能性がある。

Autophagy は細胞死の一つであり、種々の病態への関与が報告されている。研究代表者は妊娠 15、16 日の母体へのステロイド投与により胎生 18 日の 胎仔後腎に autophagy が生じることを見いだした。ステロイドによるネフロン数、腎サイズ減少が後腎間葉、尿管芽の autophagy による可能性、さらに autophagy 阻害薬による治療の可能性が考えられる。

Lithium には後腎間葉分化作用があるが、そのメカニズムは β-catenin の不活化酵素 GSK3β の阻害である。β-catenin は尿管芽分岐および後腎間葉細胞増殖、分化を誘導する。母体低栄養腎胎生早期に β-catenin の発現が低下していることから lithium による β-catenin 活性化によりネフロン数減少を治療できる可能性がある。ヒト早期産児においてネフロン形成は生後 40 日で終止するが lithium によりネフロン形成促進、ネフロン形成終止の延長が可能かもしれない。ラットのネフロン形成は生後も続くため、ヒトの早期産児のモデルとなり得る。

DOHaD 仮説の機序の１つとしてエピジェネティクス（DNA の配列変化ではなく DNA、染色体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）が示唆されている。DNA メチル化、ヒストン修飾、テロメア維持などがある。ネフロン数減少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、母体低蛋白によるネフロン数減少は次世代に継承される。

２．研究の目的

(1) 子宮内胎仔発育遅延モデルにおけるネフロン数減少機序の検討

①母体低栄養、ステロイドモデルにおける caspase-3 の役割

②母体ステロイドモデルにおける autophagy の役割

(2)子宮内胎仔発育遅延モデルにおけるネフロン数減少の治療

①母体低栄養、ステロイドモデルにおける lithium の効果

②母体ステロイドモデルにおける autophagy 阻害薬の効果

(3)母体低栄養モデルにおける継世代的伝達機構の検討

３．研究の方法

(1) 母体低栄養によるネフロン数減少における Casp3 の役割を解明する。尿管芽細胞、後腎間葉細胞、Casp3 の阻害薬を用いた *in vitro* の系により Casp3 の細胞運動、細胞骨格への作用を検討する。また Casp3 のノックアウトマウスを用い母体低栄養による Casp3 の機能的意義を *in vivo* で解明する。

(2) Lithium を母体低栄養および対照ラット新生仔に投与し糸球体数が増加するか否かを検討する。生後 2 週、麻酔後 Alcian blue を心臓から注入、摘出した腎臓を塩酸で溶解、懸濁、糸球体数を顕微鏡下で計数する。Lithium の作用機序を不活型リン酸化 GSK3β の発現、β-catenin の細胞内局在で確認する。

(3) 母体ステロイドモデルにおける autophagy の役割を検討する。GFP 標識-LC3 トランスジェニックマウス（GFP-LC3#53 マウス）を用い autophagy が尿管芽、後腎間葉かのどちらで生じているのかを検討する。デキサメサゾン（DEX）を器官培養系で投与すると尿管芽分岐が抑制される。そこで *in vitro* の系においても autophagy が生じているかを GFP-LC3#53 マウス胎仔腎器官培養により検討する。尿管芽染色、糸球体染色により DEX の autophagy を介するネフロン形成抑制機序が尿管芽分岐抑制なのか、後腎間葉細胞死によるのかを明らかにする。また培養尿管芽細胞、後腎間葉細胞に DEX を添加し autophagy の有無を検討する。母体ステロイド投与によりアポトーシスは増加しないことを確認する。Autophagy が *in vitro* において確認された場合、autophagy 阻害薬の効果を GFP-LC3#53 マウス後腎の器官培養系で検討する。*In vitro* で効果が認められた場合、さらに *in vivo* における効果を検討する。母体に DEX 投与時から *in vivo* の投与が可能な autophagy 阻害薬の投与を行い、胎生 18 日にネフロン数増加が認められれば、長期的治療効果を評価する。

(4)胎内環境によるネフロン数減少はエピジェネティクな修飾を受け、次世代に継承される可能性がある。そこでメチル化 DNA 免疫沈降法を用いた網羅的解析を行う。母体低栄養、対照の胎生 18 日の後腎から DNA を抽出し、抗メチル化シトシン抗体で免疫沈降、プロモーターアレイ解析を行う。またヒストンを抽出し、ヒストン修飾抗体を用いたウェスタンブロットを行う。差が認められた抗体を用いた ChIP on chip 法による解析を行う。腎発生に関係する遺伝子のデータベースとの照合により機能的意義の高いと思われる遺伝子を選定する。ヒストンアセチル化の低下がみられれば脱アセチル化酵素阻害の効果を検討する。

４．研究成果

得られた成果は以下である。

(1) Casp3-/-ノックアウトマウスホモ接合体（Casp3-/-）の糸球体数はヘテロ接合体（Casp3+/-）に比し 30%減少していた。そこで糸球体数の決定因子である胎仔後腎の尿管芽分岐数を調べた。胎生 13 日の Casp3-/-の尿管芽先端数は Casp3+/-の 1/3 であった。この理由として Casp3 の尿管芽細胞の細胞運動への関与が考えられた。尿管芽細胞の 3 次

元コラーゲンⅠゲル内培養系でみられるcord formation、Boyden chamber 法による細胞遊走はCasp3阻害薬により抑制され、より生理的な細胞遊走の評価法 wound healing assay においてもCasp3阻害薬は培養尿管芽細胞の遊走を遅延させた。また Casp3 が創傷部のleading edgeの細胞において活性化されていた。Casp3はROCK1、p38などの腎発生に重要な kinase および β-catenin を切断し、それらの活性を制御することが知られている。Casp3-/-後腎のP-MYPT1(ROCK1活性の指標)、β-catenin の発現はCasp3+/-に比しそれぞれ減少、増加していた。したがって母体低栄養により低下する活性型Casp3はROCK1活性化、β-catenin 不活化を介しネフロン形成を阻害する可能性が考えられる。

(2) Casp3阻害薬存在下で培養された後腎の尿管芽分岐数、サイズは減少しWnt11ノックアウトマウス腎に類似する。そこで Casp3 の Wnt11 シグナル伝達および尿管芽分岐における役割を検討した。Casp3 阻害薬は創傷治癒を抑制した。Wnt11は尿管芽細胞のCasp3活性を増加したがアポトーシスはみられなかった。Wnt11 により MYPT1 が増加、活性型 β-catenin が減少したが、Casp3 阻害薬はこれを抑制した。尿管芽細胞の創傷治癒をWnt11は促進したが、ROCK1阻害薬、β-catenin の不活化酵素 GSKβ の阻害薬はその効果を抑制した。Casp3 が Wnt11 の下流で ROCK1、β-catenin を介し尿管芽分岐を誘導する可能性が示唆される。

(3) β-catenin活性化作用を有するlithiumを新生仔ラットに投与、生後3週における糸球体数を比較した。Lithium は毒性を有し、恐らく腎性尿崩症を来すためと考えられるが、体重減少を来たし致死となった。Lithiun 投与量、投与日数を漸減し、体重に影響しない量を投与したラットの生後3週の糸球体数を比較したが、差は認められなかった。Lithium投与によるネフロン数増加の試みはその腎副作用のため現実的でないと考えられた。

(4) 母体低栄養および対照の胎生 18 日後腎のDNAメチル化をMeDIP-chip法により検討した。15911のプロモーター領域のうち7330領域が母体低栄養でのみメチル化されていた。メチル化により転写が制御されている可能性のある遺伝子の GO カテゴリーは多い順にシグナル伝達、転写、トランスポート、アポトーシス、発生であった。そのうち腎発生に関与する遺伝子のほとんどが尿細管分枝に重要であった（メチル化の多い順に PI3K、β-catenin、アクチビン A 受容体、ヘパリン結合EGF様成長因子、integrinβ4、HGFなど）。

これらの成果は過去に国内外を問わず報告されていない。(3)は negative data であるため発表は予定していないが、他の３成果については英文誌に投稿する。また期限内に達成できなかった Casp-/-における母体低栄養の影響、母体ステロイドモデルにおける autophagy の役割についても今後検討予定である。母体低栄養におけるCasp3の役割が証明されれば(1)、(2)の成果のインパクトはさらに大きくなると考えられる。母体低栄養におけるエピジェネティクスについても今後さらに検討を進める。

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. 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、印刷中
2. 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、印刷中

3. 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.
4. 粟津緑: 腎発生からみた branching morphogeneis. 日本小児腎臓病学会雑誌、査読あり 27: 2014、19-22.
5. 粟津緑: 腎疾患と DOHaD. 産科と婦人科、査読なし 5: 2013、605-609.
6. 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、β catenin を介し尿管芽分岐を誘導する. 発達腎研究会誌、査読なし 21: 2013、12-14.
7. 粟津緑: DOHaD と腎障害. 小児内科、査読なし 44:166-169、2012
8. 粟津緑: 腎臓病の発生学的起源. 体液研究会会誌、査読なし 3: 2011、3-7.
9. 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、査読なし 31: 2011、41-43.
10. 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、査読なし 19: 2011、7-10.

〔学会発表〕(計 25 件)

1. 粟津緑: 小児高血圧診療における ABPM. 第 48 回近畿小児腎臓病研究会, 3 月 29 日、2014、大阪. 招待講演
2. Hida M, Awazu M: Maternal undernutrition alters DNA methylation profiles in rat embryonic kidney. DOHaD2013, November 17, 2013, Singapore.
3. 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. 日本人類遺伝学会、11 月 21 日、2013、仙台.
4. Awazu M, Hida M: Global and gene-specific hypomethylation by maternal undernutrition in rat embryonic kidney. Renal Week 2013, November 8, 2013, Atlanta, USA.
5. Matsumura K, Hida M, Awazu M: Tubular dysfunction in extremely low birth weight survivors. Renal Week 2013, November 7, 2013, Atlanta, USA.
6. 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 22 回発達腎研究会、9 月 15 日、2013、高槻.
7. Awazu M: When and how to use ABPM in the evaluation of hypertensive children. August 30, 2013, Shanghai. 招待講演
8. 粟津緑: 腎発生からみた branching morphogenesis.第 48 回日本小児腎臓病学会, 6 月 29 日、2013、徳島. 招待講演
9. 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 ROCK1、β catenin を介し尿管芽分岐を誘導する. 第 48 回日本小児腎臓病学会、6 月 29 日、2013、徳島.
10. 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、5 月 12 日、2013、東京.
11. 粟津緑、長田道夫、飛弾麻里子: Caspase-3 は Wnt11 により活性化され ROCK1、β catenin を介し尿管芽分岐を誘導する. 第 56 回日本腎臓学会、5 月 12 日、2013、東京.
12. 松村和哉、飛弾麻里子、粟津緑: 超低出生体重児における尿細管機能の検討. 第 56 回日本腎臓学会、5 月 11 日、2013、東京.
13. Awazu M, Yamaguchi Y, Miura M, Hida M: Caspase-3 acts downstream of Wnt11 and stimulates branching morphogenesis by activating Rho-associated protein kinase 1 and inhibiting β catenin signaling. Renal Week 2012,November 2, 2012, San Diego,USA.
14. Hida M, Awazu M: Maternal undernutrition alters DNA methylation

profiles in rat embryonic kidney. Renal Week 2012, November 1, 2012, San Diego,USA.

15. 粟津緑、山口良文、長田道夫、三浦正幸、飛彈麻里子: Caspase-3 は Wnt11 により活性化され Rho-associated protein kinase 1、β catenin を介し尿管芽分岐を誘導する. 第 21 回発達腎研究会、8 月 26 日、2012、東京.

16. 松崎陽平、飛彈麻里子、有光威志、三輪雅之、北東功、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 48 回日本周産期・新生児医学会学術集会、7 月 10 日、2012、大宮.

17. 松村和哉、飛彈麻里子、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 回小児腎臓病学会、6 月 30 日、2012、東京.

18. 粟津緑、山口良文、三浦正幸、飛彈麻里子: 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 回小児腎臓病学会、6 月 29 日、2012、東京.

19. Hida M, Hashiguchi A, Kosaki K, Awazu M: A case of secondary FSGS in a 19-year old male with Russell-Silver Syndrome. The 10th. Japan-Korea. Pediatric Nephrology Seminar, Tokyo, May 12, 2012, Tokyo.

20. 粟津緑: 発達腎臓学から考える腎不全対策. 第 28 回中国四国小児腎臓病学会, 10 月 23 日、2011、松山. 招待講演

21. 粟津緑、山口良文、三浦正幸、飛彈麻里子: 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. 第 20 回発達腎研究会、8 月 28 日、2011、東京.

22. 粟津緑、長田道夫、飛彈麻里子: Caspase 3 は尿管芽細胞の細胞運動を促進する. 第 54 回日本腎臓学会、6 月 17 日、2011、横浜.

23. 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, June 3, 2011, Fukuoka. 招待講演

24. Awazu M: Maternal nutrient restriction alters renal development. The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology, June 3, 2011, Fukuoka.

25. 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 会日本小児科学会, 4 月 15 日、2011、東京.

〔図書〕（計 1 件）

1. 粟津緑、診断と治療社、細胞培養・器官培養、小児腎臓病学　2012、P90-91、編集日本小児腎臓病学会.

〔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
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

(3)連携研究者
なし