

胎児期低栄養による  
成人期腎障害および高血圧発症機序の解明

日本大学大学院医学研究科博士課程

内科系小児科学分野専攻

清水翔一

修了年 2021 年

指導教員 森岡一朗

胎児期低栄養による  
成人期腎障害および高血圧発症機序の解明

日本大学大学院医学研究科博士課程

内科系小児科学分野専攻

清水翔一

修了年 2021 年

指導教員 森岡一朗

## 目次

【概要】 .....	1
【諸言】 .....	4
【対象と方法】	
1. 妊娠期低栄養状態ラットの作製と産仔ラットの管理 .....	10
2. 虚血再灌流腎の LRC の検出 .....	13
3. EPC 機能評価 .....	14
4. 腎臓由来 MSC の単離・培養・確認 .....	14
5. 腎臓由来 MSC の TGF- $\beta$ 1 によるメサンジウム細胞への分化 .....	15
6. 腎内アンジオテンシンII測定 .....	16
7. 腎臓由来 MSC のオープンクロマチン領域の解析 .....	16
8. 統計解析 .....	18
【結果】	
1. 各群産仔ラットの表現型 .....	19
2. 腎髄質の虚血再灌流腎の Brdu 陽性 LRC 数の評価 .....	20
3. EPC 機能評価 .....	20
4. 腎臓由来 MSC の単離・培養・確認 .....	21
5. 腎臓由来 MSC の TGF- $\beta$ 1 によるメサンジウム細胞への分化 .....	21
6. 腎内アンジオテンシンII測定 .....	22

7. 腎臓由来 MSC のオープンクロマチン領域の解析 .....	22
【考察】 .....	24
【本研究の実験限界と今後の検討課題】 .....	31
【結論】 .....	33
【謝辞】 .....	34
【表】 .....	35
【図】 .....	38
【引用文献】 .....	54
研究業績 .....	60

## 【概要】

日本では平均出生体重が減少し、低出生体重児の出生頻度が増加しており、母親の妊娠期の栄養不足が原因とされている。また出産時の児の体重は、その後の児の発育状況や健康に大きな影響を与えることも明らかとなっていて、胎児期低栄養の子宮内環境で生活習慣病素因が形成され、負の生活習慣が負荷されることで生活習慣病が発症すると言う「胎児プログラミング仮説」が唱えられている。特に必須栄養素の一つであるタウリン不足と胎児期低栄養による生活習慣病発症との関連も指摘されている。また、これら DNA 塩基配列の変化を伴わない後天的な遺伝子制御はエピジェネティクスと言われ、その変化はエピジェネティック情報と呼ばれている。

胎児期には組織幹細胞や前駆細胞が器官形成に関わっているが、これら幹細胞や前駆細胞はエピジェネティック情報の記憶を有していることが知られている。そこで今回、胎児期低栄養による生活習慣病発症の機序は、エピジェネティック情報の異常により、成人期に組織幹細胞や前駆細胞の修復機能低下から慢性腎臓病などの生活習慣病発症の一因になるという仮説を立てた。この研究では、妊娠期低栄養ラットを作成し、妊娠期の飲水としてタウリン水を与えた母胎、与えなかった母胎それぞれからの産仔ラットを用いた。その上で 1) 血圧の変動をモニタリングする。2) 腎尿細管修復細胞である Label-retaining cells (LRC) の評価をする。3) 血管内皮前駆細胞 (EPC) コロニー形成にて EPC 機能評価をする。4) 腎臓由来間葉系幹細胞 (MSC) の単離・培養しその特徴を評価する。5) MSC のエピジェネティック情報の一部としてオープンクロマチン領域の評価を行なった。

胎児期低栄養の産仔ラットは、出生後より一貫して低体重で推移し、血圧は 44 週齢（成獣期）以降に有意な上昇を認めた。またタウリン補填はそれらの変化を予防した。腎臓修復細胞である LRC は胎児期低栄養の産仔ラットと胎児期正常栄養の産仔ラットでの基礎レベルには差がなかったが、腎臓の虚血再灌流障害を与えると胎児期低栄養の産仔ラットで有意に低下していた。また、胎児期低栄養の産仔ラットの EPC コロニー形成能は胎児期正常栄養の産仔ラットに比して著明に低下していた。またその低下は母胎にタウリンを補填することで改善した。胎児期低栄養の産仔ラットの MSC は、正常栄養母胎の産仔ラットの MSC に比して *h-caldesmon*、 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) を高発現し、より間葉細胞に分化していた。さらに転写因子 Liver X receptor alpha (LXR- $\alpha$ ) を高発現することによりレニンを発現し、組織レニン・アンジオテンシン(RA)系の亢進により成獣期の高血圧、腎線維化に関与している可能性が示唆された。腎臓 MSC のオープンクロマチン領域の解析では、胎児期正常栄養の産仔ラットの MSC と比較して、胎児期低栄養の産仔ラットの MSC でのオープンクロマチン領域の変化により、*Protease activated receptor 2*、*Chac1*、*Tspan6* の 3 つの遺伝子の発現亢進がみいだされた。以上より胎児期低栄養の出生児の腎臓由来 MSC はオープンクロマチン領域の変化に基づき、間葉細胞により分化しており、RA 系の亢進により成獣期の高血圧に関与している可能性が考えられた。さらに前駆細胞 LRC および EPC の組織修復機能の低下が成獣期の腎障害や血管障害の一因になっていると考えられた。

今回の研究で、胎児期低栄養による高血圧、腎障害や血管障害の機序に、腎臓由来間葉系幹細胞の記憶の異常、前駆細胞の組織修復能の異常が関与してい

る可能性が示唆された。

## 【緒言】

### 胎児期低栄養による生活習慣病発症機序に関する仮説

日本は先進国の中で、平均出生体重が減少し、低出生体重児の出生頻度が増加している唯一の国と言われ、2005年以降平均9.6%の割合で低出生体重児が出生している(1)。若年女性のやせ願望による不適切な栄養摂取が妊娠期間中にも実行されることや、妊娠中の体重増加に対する過度な栄養制限が原因と考えられる。また出産時の児の体重は、その後の児の発育状況や健康に大きな影響を与えることも明らかとなっている。英国Southampton大学のDavid Barkerは、胎児期低栄養の子宮内環境で生活習慣病素因が形成され、負の生活習慣が負荷されることで生活習慣病が発症すると言う「胎児プログラミング仮説」を提唱した(2)。さらに近年では、「発達期の個体において環境の変化に対応した不可逆的な変化が生じ、このような変化が発達の完了した時期の環境に適応できなければそれは成人期に種々の疾患の源となる」というGluckmanらが提唱したのがいわゆるDevelopmental Origin of Health and Disease (DOHaD)仮説(3)が定着してきた。

これまでの大規模疫学研究により、低出生体重が成人期になってからの冠動脈疾患、高血圧、慢性腎臓病、糖尿病、肥満、メタボリックシンドロームなどの多様な非感染性疾患（non-communicative disease : NCD）の発症リスクを増加させることが明らかになっている(4)。1つの原因として胎児期に低栄養環境にあると、中枢神経系の発達に集中的に栄養が消費されるため、末梢の腎臓や脾臓などの臓器の器官形成に消費される栄養が不足し、未成熟のまま形成されるとい



うトレードオフ現象が知られている(5)。またp53遺伝子の低メチル化による過剰発現に伴う腎臓ネフロン数、膵臓β細胞の減少と臓器細胞のアポトーシスの亢進や、メチオニン、葉酸欠乏による血中ホモシスチン濃度の増加による血管内皮細胞機能障害も報告されている(6)。

## 胎児発育におけるタウリンの役割

タウリンは生物の体内に存在する含硫アミノ酸様化合物であり、浸透圧調節、タンパク質安定化、 $\text{Ca}^{2+}$ 調節、抗酸化、抗炎症作用などを介して生体の恒常性維持において重要な役割を果たしていると考えられている。哺乳動物におけるタウリンの生体内への補給経路は食事からの摂取と体内での生合成である。体内での生合成は、システインからシステインスルフィン酸、ヒポタウリンを経てタウリンに至る経路の他、4'-ホスホパンテテインから生成するシステアミンがヒポタウリンに酸化されタウリンが生成する経路、そしてシステイン酸から直接タウリンが生成する経路の3つであると推定されている(7)。成獣ラットではこの合成経路の活性が非常に高いとされている。しかし妊娠末期のメスラットの肝臓のタウリン濃度は減少する(8)。一方で胎仔ラットでのタウリン合成能は極めて低いにも関わらず、羊水や臍帯血では母体血より濃度が高く(9)、胎盤のタウリントランスポーターによる濃縮機構が存在する。すなわち、胎児・新生児のタウリンは殆んど母体由来であり、胎児のタウリンは母体血から胎盤経由で供給される(10)、母胎にとってタウリン摂取は、その胎仔への供給の意味で大変重要である。

そして、胎児期のタウリン摂取不足は神経幹の形成を抑制し (11)、更に膵β細胞の減少による、成人期の糖尿病の原因となり得ると報告されている(12)。これらの病態はそれぞれ胎児期にタウリンを補充すると発症しない事が知られている。タウリン不足は胎児期低栄養による生活習慣病発症に関わっていると考えられる。また家森らのWHO Cardiac Studyによる世界の食品調査では、タウリン摂取が心血管病の進展を抑制していると報告(13)されており、タウリンと心血管病の関連も注目されている。

#### 組織幹細胞による成人期の組織修復機構

胎生期の臓器形成を司っている細胞は造血幹細胞、間葉系幹細胞(MSC)、神経幹細胞などの組織幹細胞であり、胎生期には活発に分裂し、各組織に分化して臓器を形成していく。一方、成人の体内でも幹細胞は存在し、造血幹細胞は骨髓に存在して、恒常的に造血を行っている。また神経幹細胞、肝臓幹細胞、腸上皮幹細胞、毛根幹細胞などが認められ、成人期でも組織形成に関わっている。これまで腎臓や心臓のような最終分化臓器には幹細胞は存在しないと考えられて来たが、最近、成人の心臓に心筋幹細胞の存在が報告され (14)や腎臓にもネフロン S3 セグメントには腎臓由来幹細胞(15)の存在が報告されている。

これらの幹細胞は、胎児期から出生後の成長期には活発に細胞分裂を繰り返して、組織への分化により臓器の成長発達に関わっておりその細胞周期も短い。しかし成人期には臓器のニッチの基底膜にカドヘリンで結合する事により、細胞周期の長い slow cycling cell として存在している(16)。これら幹細胞は一度そ

の臓器に傷害が起きると、カドヘリンの発現が低下することによりニッチから離れ、本来の幹細胞として細胞周期が急激に短くなり、細胞分裂を繰り返して臓器形成と同じように障害臓器を修復する修復細胞として働いていることが知られてきた(17)。従ってこれらの幹細胞の機能が悪いと、成人期の臓器障害に対し臓器修復が不十分となり心血管腎臓病などが発症すると考えられる。Wooらは胎児期低栄養により筋幹細胞に障害があり、成人になってから筋障害への修復が出来なくなる事を認めた(18)。一方、Dzauらのグループは腎臓内 MCS の存在とその役割について検討し、JG 細胞にも分化し、レニン産生を行い血圧調節に関わっていると報告している(19)。

Maeshimaらは、腎尿細管に、自己複製をしないがslow cyclingな幹細胞性を持っている細胞であるLabel-retaining cells (LRC) が存在することを報告した(20)。LRCは正常ラット腎の尿細管、糸球体、そして管周囲の毛細血管に観察され、ラットの虚血再灌流障害の急性腎不全モデルにおいて、尿細管再生過程で増殖細胞の供給源として機能し腎障害の修復細胞として働く前駆細胞であることが明らかになった。興味深いことに、再生初期のLRCは、分裂するとその一方のみに間葉系マーカーであるvimentinを発現していた。また、再生後期ではLRCの多くが上皮系マーカーであるE-cadherin陽性細胞に囲まれていた。組織幹細胞は非対称分裂により自己複製するとともに、transit-amplifying 細胞を産生し、それらが分裂を盛んに行うことによって元の組織を再構築すると考えられている(21)。

血管内皮前駆細胞 (EPC) は骨髓造血幹細胞由来で末梢血中に0.01%程度存在し、血管新生に関わっていることが知られている(22)。Hillらは高血圧症、脂質

異常症、糖尿病患者のEPC機能をコロニーアッセイで評価し、EPC機能低下と最終的な血管障害、内皮機能がよく相関することを報告した(23)。つまりEPCは高血圧症、糖尿病などの酸化ストレス病態において傷害された血管を修復している修復細胞と考えられ、EPC機能が低下すると修復が不十分で血管障害が確立すると考えられる。

近年、幹細胞や前駆細胞に記憶能力（幹細胞メモリー）があることが分かって来た(24, 25)。幹細胞にメカニカルストレスを与えるとメモリーとして幹細胞機能に組み込まれる(26)。この様に胎生期に低栄養で臓器形成を余儀なくされた幹細胞はその状態を記憶しており、これが成人期の多様な胎児期低栄養での生活習慣病発症に関わる可能性が考えられる。一方、DNA塩基配列の変化を伴わない後天的な遺伝子制御の変化はエピジェネティクスと言われ、その変化はエピジェネティック情報と呼ばれている。この幹細胞メモリーは幹細胞のエピジェネティック情報の維持と考えられる。つまり子宮内での適応は、エピジェネティック情報に基づいた機序を介して遺伝子発現調節を行うため、胎内の環境に適した表現型は生後も持続し、好転した胎外環境にはむしろ過適応となってしまうことが想定されている(27)。この様に生活習慣病胎児期発症説の新たな可能性として、胎児期の低栄養、とりわけタウリン欠乏が組織幹細胞にエピジェネティック情報の異常を来し、組織修復機能を抑制し、組織障害時の修復要求に対応できなくなることが考えられる。

そこで今回胎児期低栄養による生活習慣病発症の機序は、出生児の幹細胞や前駆細胞のエピジェネティック情報の異常により、成人期に腎臓由来MSCの変化やLRCおよびEPC機能低下から、慢性腎臓病や高血圧などの生活習慣病が発

症するという仮説を立てた。

この研究では、妊娠期低栄養ラットを作製し、妊娠期の飲水としてタウリン水を与えた母胎、与えなかった母胎それぞれからの産仔ラットを作成する。その上で 1) 血圧の変動をモニタリングする。2) 腎尿細管修復細胞である LRC の評価をする。3) EPC コロニー形成にて EPC 機能評価をする。4) 腎臓由来 MSC の単離・培養しその特徴を評価する。5) 腎臓由来間葉系幹細胞のオープンクロマチン領域の評価を行い、胎児期低栄養による腎障害および高血圧発症の新しい機序を解明する事を目的とする。

## 【対象と方法】

### 1. 妊娠期低栄養状態ラットの作製と産仔ラットの管理

本研究における動物実験は、日本大学動物実験委員会により承認された動物実験計画に則り実施した（承認番号：AP16M028-4）。

#### 1-1 妊娠期低栄養状態ラットの作製

7週齢のメス Wistar ラットを日本チャールス・リバー株式会社（横浜）より購入し、1週間の環境馴化後、Control 群（C 群）と胎児期低栄養として低蛋白食群（LP 群）に分けた。C 群には通常食 MF（オリエンタル酵母工業株式会社、東京。蛋白質含有量 23.1%）、通常飲水を与えた。低蛋白食群はさらに LP 群とタウリン補充を行った LPT 群に分け、両群とも 8 週齢から蛋白質含有量を 8%にした低蛋白食（オリエンタル酵母工業株式会社）を与え、LP 群には通常飲水、LPT 群には 3%タウリン水（富士フイルム和光純薬株式会社、東京）を与えた。表 1 に各群の飼料と飲水をまとめた。LP 群に与える低蛋白食の組成は表 2 の通りとなっており、総エネルギーに差異がないように、可溶無窒素物（糖質）の量を調整した。また LP 群の飼料にタウリンは含有していない。9 週齢のオス Wistar ラットを日本チャールス・リバー株式会社より購入し、1 週間の環境馴化後、10 週齢のメスと 2 週間同居させる。オスはメスと同居している間以外は、全て通常食、通常飲水を与えた。産仔が得られた後も離乳するまでメスラットにはそのままでの飼料、飲水を与えた。産仔ラットはオスを用いた。オスのみを使用する理由として、モデル動物を複数作製する上で、メスは性周期によるホルモン分泌に差が

あるので均一なデータを得る上では一般的に適していない。個々の性周期のバラつきが、EPC や酸化ストレス状態に及ぼす影響を考慮した。またメスでは血管障害（動脈硬化）を起こさないことも知られており(28)、その観点からもオスを使用した。

## 1-2 研究プロトコルの概要

プロトコルの流れを図 1 に示した。まず以下の 3 群について実験に使用した。

- ・正常食母胎 (C) 群の産仔ラット：通常食・通常飲水のメス得られたオスの産仔ラット
- ・低蛋白食母胎 (LP) 群の産仔ラット：低蛋白食・通常飲水のメスから得られたオスの産仔ラット
- ・低蛋白食＋タウリン補充母胎 (LPT) 群の産仔ラット：低蛋白食・3%タウリン水のメスから得られたオスの産仔ラット

C 群については 3 頭の母胎から、LP 群、LPT 群はそれぞれ 6 頭の母胎から産仔ラットを得た。雄体との同居開始日から出産までの日数は、平均で C 群で 27.3 日、LP 群で 25.3 日、LPT 群で 27.5 日であり、差は認めなかった。各群の産仔ラットは生後 21 日目に離乳し、離乳後は通常食・通常飲水を与えた。14 週齢、30 週齢において一部ラットを使用し 2.以降の実験に使用した。60 週齢まで観察したラットについては 2 週に一度体重測定（上皿自動秤 K-1 型 800g、富士計器（株）、名古屋）と tail-cuff 法（ソフトロン非観血式自動血圧測定装置 BP98A、

ソフトロン（株）、東京）にて血圧測定を行った。血圧はラット毎に 5 回連続して測定し、その最高ならびに最低血圧を除いた 3 回の平均血圧を用いた。60 週齢に達した所で苦痛軽減の為、イソフルラン吸入麻酔（導入 4-5%、維持 2-3%）し、消毒後腹部を正中切開、下大静脈より全採血による安楽死処置をした。全採血した血液より各種検査施行した。

### 1-3 糸球体障害指数(Glomerular Injury Scores: GIS)と尿細管間質障害指数(Tubular Injury Scores: TIS)の評価

Sabbatini らの研究(29)を参考に腎障害のスコア化を行った。C 群、LP 群の産仔ラットを 30 週齢、60 週齢において苦痛軽減の為、イソフルラン吸入麻酔（導入 4-5%、維持 2-3%）し、消毒後腹部を正中切開し腎臓を摘出し、10%ホルマリン固定、ブロック作製した。スコアリングにあたって bias を排除するため、ブラインド下で腎臓組織の有識者によるスコアリングが行われた。ラット腎臓を Hematoxylin Eosin 染色及び Masson Trichrome 染色を行い、糸球体障害の定量化のために 30 個の糸球体をランダムに選出し、それぞれの糸球体の間質占拠率を評価し下記の通りにスコア化した。糸球体障害指数(Glomerular Injury Scores: GIS) は、 $[(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)] \div 30$  で計算した（n にはそれぞれ下記の 0~4 のグレードの糸球体数を入力）。尿細管間質傷害の定量化のために 20 領域をランダムに選出し、線維化の度合いを下記の通りスコア化した。尿細管間質障害指数(Tubular Injury Scores: TIS) は、 $[(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)] \div 20$  で計算した（n にはそれぞれ下記の 0~4 のグレードの糸球体数を入力）。



1) GIS (a minimum of 30 glomeruli)

0: normal appearance

1: involvement of up to 25% of the glomerulus

2: involvement of 25 to 50% of the glomerulus

3: involvement of 50 to 75% of the glomerulus

4: involvement of 75 to 100% of the glomerulus

2) TIS (20 randomly selected cortical areas)

0: normal appearance

1: involvement of less than 10% of the area

2: involvement of 10 to 30% of the area

3: involvement of 30 to 50% of the area

4: involvement of more than 50% of the area

## 2. 虚血再灌流腎の LRC の検出

Maeshima らの方法(30)に基づき ALZET (ALZET Corp., CA, USA)ポンプを用い、11 週齢の各群産仔ラットに、BrdU (100 mg/kg/day)を 1 週間腹腔投与後に、ALZET ポンプを摘出した。2 週間後の 14 週齢にイソフルラン吸入麻酔（導入 4-5%、維持 2-3%）を行い、消毒後腹部を切開し右腎を摘出した後、左腎に 45 分間左腎動脈のクリッピングにて虚血操作を行い、虚血解除の後閉創した。24 時間後に左腎切除した後、安楽死処置をした。左腎はパラフィン固定した。4 $\mu$ m 切片を Monoclonal anti-Bromodeoxyuridine (clone BU-1) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)

及び2次抗体 Alexa Fluor488(Goat anti-Mouse IgG)(abcam, Cambridge,UK)を用いて蛍光免疫染色を行い、BrDU 陽性細胞にて LRC の検出を行った。DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 染色にて細胞核を染色し、BrdU 陽性細胞数/総細胞数 (DAPI 染色陽性細胞数)  $\times 100$  にて補正した上で、各群  $n=3$ 、それぞれ5視野の計15視野で比較した。

### 3. EPC 機能評価

60週齢において各群産仔ラット下大静脈から全血採血し、単核球を分離した。それぞれ6-well dish に  $5 \times 10^6$  /5ml/well の単核球を播種し、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターの中に入れ、24時間培養した。同時に24-well dish に Vitronectin + Gelatin を入れ、24時間 CO<sub>2</sub> インキュベートした。培養後、非付着細胞を回収し培養液に浮遊させ、細胞数をカウント、 $2 \times 10^6$  /ml/well に調整、再播種し、6日間培養した。方眼接眼マイクロメーターを用い、直径0.13mm以上の colony 数を4well / sample カウントし、1wellの平均値を算出し、EPC機能を評価した。

### 4. 腎臓由来 MSC の単離・培養・確認

Wangらの方法(19)に基づき、C群、LP群の14週齢の産仔ラット各群3頭にイソフルラン吸入麻酔(導入4-5%、維持2-3%)し、消毒後腹部を切開し腎臓を摘出した後、安楽死処置をした。摘出した腎臓を洗浄、粉碎、濾過、溶血処理の後、100 mm Dishで培養開始し、初代培養細胞を得た。培養は10%ウシ胎児血清(FBS)を含む正常糖濃度Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, D6046, glucose 5.6mM, Sigma-Aldrich)にペニシリン100 単位/ml、ストレプトマイシン100  $\mu$ g/ml

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を添加し培養を行った。数日で細胞がDish内でサブコンフルエントになっていることを確認し、培養液を除きリン酸緩衝液 (Phosphate-buffered saline, PBS, Sigma-Aldrich) で2回洗浄した後、Tryple Express (12605010, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) で細胞を剥離・回収し、継代培養した。培地の交換は週2〜3回の頻度で行い、サブコンフルエントになる毎に継代培養を繰り返した。1×10<sup>7</sup> cell/mlまで細胞数増やしたところで、Dynal CELlection Biotin Binder Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用しCD44陽性細胞を単離し、継代培養を継続した。この細胞に、CD34、CD44、CD45、CD90抗体を用いてフローサイトメトリー (Gallios, BECKMAN COULTER, CA, USA) を行った。

## 5. 腎臓由来MSCのTGF-β1によるメサンジウム細胞への分化

単離した腎臓由来MSCに対して、Transforming growth factor-β1 (TGF-β) (R&D Systems., Minneapolis, MN, USA) を0、6、12、18日間インキュベートし、細胞から蛋白を抽出し、ウエスタンブロット分析に供した。6 wellのplateに5×10<sup>4</sup> cell/well ずつ細胞を調整し、上記と同様の培養液を用いて、それらにTGF-β1 (5 ng/ml) を添加した。得られた細胞は培地を破棄後に、PBSで2回細胞を洗浄したのち、PIPA buffer 1mlで細胞を回収後、超音波破砕機Bioruptor UCD-250を使用して可溶化した(200 W, 10秒ON/ 20秒OFF/ 25 cycle)。細胞核内のUSF1タンパクは、dishの培地を破棄後に、PBSで2回細胞を洗浄したのち、スクレーパーで細胞を回収し、低張液(10mM HEPES (pH7.9, 10mM KCl, 0.1mM EGTA, 0.1mMEDTA, 1mMDTT 0.5mM PMSF ) 300μlに分散させ、氷上で15分インキュベーションした後、4℃、3000回転で1分間遠心分離を行い、上清を破棄した。核画分である沈殿をPIPA

buffer 200 $\mu$ l で分散し、Bioruptor UCD-250を使用して細胞核を破砕した(250 W, 30秒ON/ 30秒OFF/ 20 cycle)。その後、15000回転で15分間遠心分離を行い、上清の核画分を得た。

これらの抽出液は、Pierce BCA protein assay kitにて蛋白定量し、95°C、5分間、熱変性処理を行った後に、10%ポリアクリルアミドゲルSDS電気泳動を行った。泳動したゲルはPVDF膜に転写し、ブロッキングを行なった。それぞれの群の各日数にてheavy-caldesmon (*h*-caldesmon)、 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA)、Liver X receptor alpha (LXR- $\alpha$ )、Renin、 $\beta$ -actinについて定量的に評価した。

## 6. 腎内アンジオテンシンII (Ang II) 測定

60 週齢において各群産仔ラット 5 頭を断頭の後、すぐに右腎臓を摘出した。簡単に脂肪組織などを除いて、エッペンチューブに入れて、液体窒素で保存した。保存したものを解凍し Sep-Pak C18 カートリッジ (Waters Associates, Milford, MA, USA) を用いてペプチドを溶出した。溶出物を遠心分離機で乾燥・分離させ、Shodex column (OPD-50, 昭和電工、東京) でさらに精製し、ラジオイムノアッセイを用いて腎内 Ang II を測定した。

## 7. 腎臓由来MSCのオープンクロマチン領域の解析

作成したC群、LP群の産仔ラットの培養MSCについて、RNA シーケンシング解析 (RNA-seq, タカラバイオ、滋賀)、Assay for Transposase-Accessible Chromatin (ATAC) シーケンシング解析 (ATAC-seq, タカラバイオ、滋賀) を各群 $5 \times 10^4$ 個の細胞を使用し実施した。RNAシーケンシングは組織などの抽出mRNAの発現量

を定量し、さらにシーケンシングをする方法であり(31)、2群それぞれの腎臓由来MSCの各遺伝子の発現変動を定量的に評価した。ATAC-seqは、ゲノムワイドでオープンクロマチン構造を選択的に検出・シーケンスすることによってクロマチンへのアクセシビリティをマッピングすることができる実験手法で(32)、抽出されるオープンクロマチン領域の中に含まれるエンハンサーといわれる転写を活性化する制御領域を同定した。つまりATAC-seqのシグナルが増加、活性化された領域の特定を行った。そのうち2群間で活性化のピークの差が大きく、さらに特に転写制御領域とその標的遺伝子の距離が近い領域、つまりより関与が大きいと考えられる遺伝子を抽出した。その結果とRNA-seqで求めている発現変動の大きさでも2群間の差異の大きな遺伝子を同定することで、2群間のオープンクロマチン領域の差異に寄与している可能性のある遺伝子を同定した。

それらで同定した遺伝子について、5. の実験の蛋白を抽出したのと同じタイミングで抽出したRNAを用いてリアルタイムPCR法によるmRNAの発現測定を行った。得られた細胞の培養液を破棄し、PBSで洗浄後、TRIzol Reagent (1559608, Ambion, Waltham, MA, USA)1mlを加えピペッティングしエッペンチューブに移した。クロロホルム200  $\mu$ lを加え転倒混和し室温で2~3分置いた後4°Cで15000回転15分間遠心分離をし、新しいエッペンチューブに上清 400  $\mu$ l を移した。上清に2-プロパノール 500  $\mu$ lを加えて転倒混和し、5~10分置いた後に4°Cで15000回転10分間遠心分離を行った。上清を捨て、沈殿物に70%エタノールを加え、混和し4°Cで10000回転5分間遠心しtotal RNAの抽出を行った。抽出したtotal RNAより、混在するDNAを除去するために1  $\mu$ g相当のtotal RNAをDNase I (18068-015, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で処理を行ってからHigh Capacity cDNA Reverse

Transcription Kit (4368814, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いてcDNAを精製した。リアルタイムPCRは、Premix Ex Taq (Probe qPCR) (RR390A, Takara, Tokyo, Japan)を用いたプローブ法で定量した。上記の方法によって得たcDNAを使用し、StepOne Plus real-time PCR system (Applied Biosystems)を用いて、95°C/20秒で加温後、95°C/1秒と60°C/20秒のサイクルを40サイクル行った。各遺伝子の発現はスタンダードを用いた相対定量で求め、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を内部標準として発現量を補正した。

## 8. 統計分析

全ての結果は平均値±標準誤差(S.E)で表記した。また、各群の有意差はStatmateIII (アトムス)にてt-検定および、マン・ホイットニーのU検定を用いて解析し、統計上  $p < 0.05$  をもって有意差ありとした。

## 【結果】

### 1. 各群産仔ラットの表現型

各群の産仔ラットの、1 母胎あたりの産仔ラットの出生数について比較した。C 群の 1 母胎あたりの産仔ラットの出生数は LP 群、LPT 群の産仔ラットに対してそれぞれ有意 ( $P<0.05$ ) に多かった。LP 群と LPT 群の産仔ラット間では差は認めなかった (図 2)。母胎の低蛋白食がその産仔ラット数にも影響した。続いて各群産仔ラットの外観についてである。図 3 の写真で代表して 3 週齢の各群の外観を比較した。他の 2 群と比較し LP 群の産仔ラットでは体毛がまばらで、毛並みも悪かった (図 3)。以後成長とともに体毛の量は他群と同等となったが、毛並みの悪さは持続した。

図 4 に各群産仔ラットの 60 週齢までの体重の推移を、図 5 に血圧の推移を示した。

体重は出生後一貫して、C 群、LPT 群、LP 群の産仔ラットの順で重量が有意 ( $P<0.05$ ) に多かった (図 4)。低蛋白食の母胎へのタウリン補填によって、産仔ラットの体重増加不良をある程度緩和することが示された。続いて、tail-cuff 法で測定した 2 週間ごとの血圧の変化を示す。成獣となった 44 週齢以降、C 群および LPT 群の産仔ラットと比較して、LP 群の産仔ラットは有意に高値であった。一方で LPT 群と C 群の産仔ラットを比較すると有意差を認めなかった (図 5)。つまり母胎が低蛋白食であってもタウリン補填することにより産仔ラットの成獣期の血圧の高値が是正されることが示された。

さらに各群産仔ラットの 60 週齢の血液検査結果を図 6 に示す。空腹時採血を

行った。血糖値、血漿レニン活性、血清尿素窒素 (BUN)、血清クレアチニン (Cr) において、各群に有意差は認めなかった。

30 週齢、60 週齢の C 群、LP 群の産仔ラットの腎臓組織標本を作製し、GIS と TIS の評価を行った。いずれの週齢においても 2 群間の障害指数に有意差はなかったが、LP 群の産仔ラットの方が、組織障害度が強い傾向にあった (図 7)。

このように体重、血圧に有意差を持って表現型の違いを認めた。

## 2. 腎髄質の虚血再灌流腎の Brdu 陽性 LRC 数の評価

14 週齢における、腎髄質の虚血再灌流腎の LRC の発現を Brdu 陽性細胞のラベリングで示した。青色で染色された部位が 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) にて染色された細胞核であり、緑色に染色された部位が BrdU 陽性細胞である。虚血再灌流腎の BrdU 陽性の LRC は各群の産仔ラットとも遠位&近位尿細管の核に局在していた (図 8)。各群 N=3 でそれぞれ 200 倍下 5 視野の計 15 視野の BrdU 陽性細胞数をカウントし比較した。C 群と比較して LP 群、LPT 群の産仔ラットでは有意に陽性細胞数は低下していた。LPT 群では LP 群の産仔ラットに比しやや増加していたが、有意差はなかった。(図 9)。つまり母胎の低蛋白食により産仔ラットの尿細管の修復細胞数の低下を認め、母胎のタウリン補填でも明かな是正効果は認めなかった。

## 3. EPC 機能評価

60 週齢における末梢血からの EPC のコロニー数を比較することで EPC の機能評価を行った。LP 群の産仔ラットは C 群および LPT 群の産仔ラットと比較し有



意な EPC コロニー数の減少、つまり EPC 機能低下を認めた。C 群および LPT 群の産仔ラットを比較すると有意差はなかった (図 10)。低蛋白食母胎にタウリンを補填することで、産仔ラットにおける EPC 機能は通常食の母胎と同程度まで改善させることがわかった。

#### 4. 腎臓由来 MSC の単離・培養・確認

C 群、LP 群の産仔ラットから単離培養した CD44 陽性細胞に対してフローサイトメトリーを行った。図 11 に示す通り CD44 および 90 の陽性を、CD34 および 45 の陰性の腎臓由来 MSC を両群とも確認し、以下の実験に使用した。

#### 5. 腎臓由来 MSC の TGF- $\beta$ 1 によるメサンジウム細胞への分化

腎臓由来 MSC の TGF- $\beta$  による細胞分化をウェスタンブロット解析にて経時的に評価した。図 12 の上図に示す通り、左側に C 群、右側に LP 群の産仔ラットの腎臓由来 MSC の結果を示した。それぞれ TGF- $\beta$ 1 による分化過程を day 0、6、12、18 と経時的にならべた。上から *h*-caldesmon、 $\alpha$ SMA、LXR- $\alpha$ 、Renin の順に記載した。LP 群の産仔ラットの腎臓由来 MSC では、C 群の産仔ラットの腎臓由来 MSC と比較して *h*-caldesmon、 $\alpha$ SMA が高発現し、より間葉細胞に分化していることが示された。また転写因子 LXR- $\alpha$  の発現も高く、これによりレニンの発現も高かった。計 3 回同様の手法で実験を行い、ウェスタンブロット解析の結果を定量化したものを図 12 の下図に示すが、再現性を持って同様の結果を得た。

## 6. 腎内アンジオテンシンII (Ang II) 測定

60 週齢の各群産仔ラットの腎内 Ang II 測定の結果を図 13 に示した。C 群の産仔ラットと比較して LP 群の産仔ラットでは腎内 Ang II が有意 ( $P<0.05$ ) に増加しており、LP 群の産仔ラットの腎臓では腎内レニン・アンジオテンシン系の亢進が示唆された。C 群と LPT 群の産仔ラット、LP 群と LPT 群の産仔ラット間には有意差は認めなかった。

## 7. 腎臓由来MSCのオープンクロマチン領域の解析

C 群、LP 群の産仔ラットの腎臓由来 MSC の ATAC-seq を行った。その結果を一定量でカットオフし、活性化しているつまり発現のピークが大きい転写制御領域、およびその標的遺伝子、計 9538 遺伝子を抽出した。そのうち 2 群間で活性化のピークの差が大きい遺伝子で、さらに特に転写制御領域とその標的遺伝子の距離が近い領域、つまりより関与が大きいと考えられる遺伝子を選んだ。C 群の方が LP 群の産仔ラットの 2 倍以上発現のピークが大きい領域と関連する遺伝子 1421 遺伝子のうち、転写制御領域と標的遺伝子の距離が 500 bp 以下と近い遺伝子はうち 203 遺伝子認めた。一方で LP 群の方が C 群の産仔ラットの 2 倍以上発現のピークが大きい領域と関連する遺伝子 171 遺伝子のうち、転写制御領域と標的遺伝子の距離が 500 bp 以下と近い遺伝子はうち 17 遺伝子認めた (図 14)。今回は LP 群の産仔ラットで発現の多い遺伝子に注目し解析をすすめ、RNA-seq において定量的に評価した発現変動とを組み合わせ評価を行った。具体的には前述の 17 遺伝子に対して RNA-seq において、C 群、LP 群の比較を行った。つまり 17 遺伝子のうち C 群より LP 群の産仔ラットの発現変動の大きかった遺

伝子を抽出し、赤枠で示した（表 3）。赤枠で示された *F2rl1*、*Chac1*、*Tspan6* の 3 遺伝子を 2 群間のオープンクロマチン領域の差異、つまり胎児期低栄養の影響に寄与している可能性のある遺伝子と考えた。

そこで、*F2rl1*、*Chac1*、*Tspan6* について腎臓由来 MSC の TGF- $\beta$ 1 によるメサンジウム細胞への分化過程における発現をリアルタイム RT-PCR で評価した。図 15 に結果を示す。*F2rl1* においては細胞の分化前、分化過程においても一貫して LP 群の方が C 群の産仔ラット由来に腎臓由来 MSC において有意に上昇していた。*Chac1* や *Tspan6* では明らかな傾向を認めなかった。

## 【考察】

今回の研究では胎児期低栄養モデルとして、妊娠ラットでの低蛋白食モデルを用いた。これまでの胎児期低栄養による生活習慣病発症の機序を解明する研究報告では、さまざまな動物実験モデルが使用されてきた。いずれも胎児に種々のストレスを与えることによりその発育に影響を及ぼし、そこで生じるプログラミングの病態を追及するためである。今回用いた妊娠母胎の蛋白制限はこの子宮胎盤循環障害を直接に模したモデルとして過去の実験にも用いられてきた。Snoeck らの方法 (33)によると、通常の食餌（蛋白20%）と8%の低蛋白食を母胎ラットに与え、その出生児が母胎の低蛋白の影響を受け低体重になることが示された。さらに母胎の蛋白制限は出生児の高血圧にも影響することが報告されている(34)。さらに膵の発達異常による耐糖能異常、血管内皮機能異常を引き起こすことが報告されている(35)。また、母胎の子宮動脈結紮による胎児発育不全モデルマウスにおいて、胎児期のタウリン補填により成人期の体重が改善したことも報告されている(36)。これらの先行実験を参考にして、蛋白質含有量を8%にした低蛋白食を母胎に摂取させ、同時にタウリン含有水の有無を併せて検討する胎児期低栄養モデルを作成し実験に用いた。

低栄養母胎からの出生児は、出生後より一貫して低体重で推移する一方、44週齢（成獣期）以降に血圧高値を認めた。また低栄養母胎にタウリンを補填することにより出生児の体重については、正常栄養母胎からの出生児よりは有意に低いものの、タウリン補填のないものより有意に改善を認めた。また血圧に関しては、タウリン補填することによって正常栄養からの出生児と同じ水準となり、高血圧の是正を認めた。本研究において胎児期低栄養状態により低体重、成獣期の

高血圧という表現型の違いを認めており、適切な動物実験モデルを作成できたと考えた。

今回の研究では胎児期低栄養の産仔ラットのLRCの動態について初めて検討した。LRCは1週間のBrdUラベリング後、2週間経過しても依然としてBrdUを保持していることから、**Slow cycling cell** であり幹細胞に近い前駆細胞で、腎尿管修復細胞として認められている (37, 38)。LRCは非対称分裂を行い、再生初期には**Vimentin**を発現するが、後期になると**E-cadherin**を発現することが知られている(30)。**Vimentin**は間葉系細胞に特有の中間径フィラメントであり、生物発生の初期段階から多彩な細胞に発現し、細胞機能に必須の構造蛋白である。また**E-cadherin**は細胞表面に存在する糖蛋白質の一群であり、細胞接着を司る分子として動物の胚形成に重要な役割を果たすとされる。したがって腎臓LRCは再生過程で増殖に富む**Vimentin**陽性細胞を作り出し、それが活発に増殖、遊走、分化して**E-cadherin**陽性の成熟した尿管上皮に分化した可能性が高いと考えられ、この特徴は組織幹細胞に類似している。**Maeshima**らはラット虚血再灌流障害モデルの実験において、再灌流後12時間後からLRCは分裂を開始し、24時間後にはその数が約2倍になったと報告した (30)。この事実は、LRCが急性尿管損傷に対して修復細胞として尿管再生において中心的な役割を果たしていると考えられる。本実験でも**Maeshima**らと同様に、各群のラットに虚血再灌流障害の実験手法を用い実験を行った。LRCは既報と同様に各群とも遠位および近位尿管の核に局在していた。そして、胎児期正常栄養の産仔ラットと比較してタウリン補填の有無に関わらず、胎児期低栄養の産仔ラットでは有意に陽性細胞数は有意に減少した。胎児期低栄養の産仔ラット間においては、タウリン補填によりLRC

細胞数はやや増加していたが、有意差はなかった。これは母胎の低栄養によって、産仔ラットは尿細管の修復細胞の低下を認め、母胎へのタウリン補填はLRCには影響していないことが示された。この様に、ラット腎臓の虚血再灌流障害モデルの実験において、胎児期の低栄養によって産仔ラットは尿細管でLRCの低下を来した。胎児期低栄養の産仔ラットの成獣期の腎臓障害は腎臓修復細胞であるLRCの低下により、腎障害を修復仕切れない事による可能性が考えられた。

今回の研究では、胎児期低栄養の産仔ラットのEPCコロニー形成能は正常栄養からの産仔ラットに比して著明に低下していた。またその低下は母胎にタウリンを補填をすることで、EPCコロニー形成能は完全に回復した。Fukudaらのこれまでの報告では高血圧モデルラット（SHR）では末梢血のEPC（血管内皮前駆細胞）コロニー形成機能低下を認め、Ang II受容体拮抗剤（ARB）投与によるEPC機能回復を確認し、酸化ストレスとEPC機能が相関する事が述べられている(39-41)。さらにSHRに比較して脳、心臓、血管、腎臓などの心血管系臓器障害が強く、腎臓においては腎硬化症を呈する、自然発症脳卒中モデルラット（SHR-SP）では大動脈、心臓、腎皮質のNADPH oxidase発現が亢進しており、組織の酸化ストレスも増加し、ARBを用いると亢進したNADPH oxidase発現の抑制作用を持つことが示唆された(40, 41)。つまり、SHR-SPでは組織Ang IIがNADPH oxidaseを介して心血管系臓器の酸化ストレスを起こし、EPC機能も低下した状態にあるが、ARBはNADPH oxidaseによる酸化ストレスを抑制し、EPC機能を改善している可能性を示した。

一方、マウスの胎児期低栄養モデルにおいて、産仔ラットの成獣期のEPC機能低下が報告されている(42)。その原因は、高血圧モデルと同様NADPH oxidase発

現の亢進による酸化ストレスの増加に起因していると考えられている。本研究においては酸化ストレスの測定は行っていないが、同様の機序によってEPC機能の低下を来した可能性が示唆された。また、母胎が低栄養であってもタウリンを補填することで、産仔ラットの成獣期のEPC機能の低下を完全に回復した。前述の通りタウリンは健常者のEPC機能を高め、SHRでは低下したEPC機能を回復させることが認められている。その機序として、タウリンの抗酸化作用により、細胞膜を安定させ、細胞の再生を促す効果(43)によると考えられる。本研究では母胎に対するタウリン補填によって、その産仔ラットの低下したEPC機能が完全に回復することが初めて示された。EPCの由来は骨髄造血幹細胞であるため、低栄養母胎での造血幹細胞のエピジェネティクス情報の異常が関与している可能性もある。このように胎児期低栄養とりわけタウリン不足による成人期の血管傷害の機序にEPCの血管修復能の低下が関与している可能性が考えられた。

一方、EPCと同様の前駆細胞である腎臓LRCも胎児期低栄養の産仔ラットでは低下していたが、低栄養母胎へのタウリン補填では低下したLRCは回復しなかった事は、EPCは造血幹細胞由来で、LRCはMSC由来であり、胎生期のタウリン不足は造血幹細胞でのみエピジェネティクス情報の異常を来し、タウリンはMSC系には影響しなかったと推察された。

今回の研究では、胎児期低栄養の産仔ラットの腎臓由来 MSC について検討した。腎臓においてもネフロン S3 セグメントに腎臓由来幹細胞(15)の存在が報告されて以降、腎臓由来 MSC に関しての研究も進んでいる。今回の実験においては、腎臓由来 MSC を単離培養し、TGF- $\beta$ 1 によるメサンジウム細胞への分化の評価および、オープンクロマチン領域の解析を行った。TGF- $\beta$ 1 は上皮細胞や組

織に対し上皮間葉化現象 (Epithelial mesenchymal transition : EMT) として上皮細胞を間葉化する事が知られているが、同様な機序で、ES 細胞、iPS 細胞や MSC に対しては線維芽細胞、血管平滑筋細胞、メサンジウム細胞など間葉系細胞に分化させる事が知られている(44)。

今回、胎児期低栄養の産仔ラット腎臓由来 MSC では胎児期正常栄養の産仔ラット腎臓由来 MSC と比較し、TGF- $\beta$ 1 の刺激の前から *h-caldesmon*、 $\alpha$ SMA が発現し、既に間葉細胞に分化していた。また転写因子 LXR- $\alpha$  も発現亢進していた。LXR- $\alpha$  はレニン遺伝子のプロモーターに結合してレニンの転写を促進する事が知られている。Matsushita らは MCS を TGF- $\beta$ 1 にて血管平滑筋細胞に分化させた場合、完全に血管平滑筋細胞に分化するとレニン産生はしないが、完全分化よりも脱分化状態では LXR- $\alpha$  によりレニンを産生する事を見出した(45)。さらに Fukuda らは SHR 由来の血管平滑筋細胞では補体 C3 が高発現しており、MCS は完全に血管平滑筋細胞に分化しないで LXR- $\alpha$  の高発現を介してレニンを高発現する事を見出した(46)。そして今回の実験では胎児期低栄養の産仔ラットの MSC は早期に間葉系細胞に分化し、レニン産生が高かった。さらに胎児期低栄養の産仔ラットの腎臓内 Ang II レベルは胎児期正常栄養の産仔ラットの腎臓内 Ang II より高かった。以上より胎児期低栄養の産仔ラット群では腎臓内 RA 系の亢進がみられ、胎児期低栄養の産仔ラットでの高血圧病態、腎線維化にかかわると考えられた。

この腎臓由来 MSC の分化異常についてオープンクロマチン領域の解析を RNA-seq および ATAC-seq を用いて行った。つまりエピジェネティクスと呼ばれる、DNA 塩基配列の変化を伴わず、細胞分裂後も継承される遺伝子発現あるい



は細胞表現型の変化のうち(47)、DNA のメチル化について評価した。

まず胎児期正常栄養の産仔ラットおよび低栄養母胎から産仔ラットにおいて、具体的に遺伝子のどの部分の発現が活性化をしているかを解析するのに ATAC-seq を用いた。ATAC-seq ではゲノム全領域の中で染色体の開いた場所を標識した。そしてこの標識はシーケンスプライマーになっており、この標識部位をシーケンスするだけで、開いた染色体、すなわち転写が活性化されている場所とその頻度を調べた。続いて RNA-seq を用いて遺伝子の発現変動を定量的に評価した。

これらの結果から胎児期低栄養の産仔ラットの腎臓由来 MSC で発現変動の大きかった *F2rl1*、*Chac1*、*Tspan6* の 3 遺伝子を同定した。それらは 2 群間のエピジェネティックな差異、つまり胎児期低栄養の影響に寄与している可能性のある遺伝子であると推察される。

腎臓由来 MSC の TGF- $\beta$ 1 によるメサンジウム細胞への分化過程における発現を、それらの遺伝子の RNA を用いてリアルタイム PCR 法による mRNA の発現測定で評価したところ、*F2rl1* において有意に低栄養母胎からの産仔ラットの腎臓由来 MSC で高値であった。このように胎児期低栄養の産仔ラットの腎臓 MSC は *F2rl1*、*Chac1*、*Tspan6* の 3 遺伝子のいずれかのエピジェネティック情報の異常を記憶して、LXR- $\alpha$  を介してレニンを産生することにより腎内 RA 系が亢進し、成獣期の高血圧に関与している可能性が示唆された。

*F2rl1* は *protease-activated receptor 2 (PAR2)* とも呼ばれ、G タンパク共役 7 回膜貫通型受容体の一種であり、血管内皮細胞に常在的に発現し、炎症および組織障害に関与し、循環や血圧の変動に寄与していると報告されている(48)。血圧との

関連では SHR ラットの血管内皮では *PAR2* の発現が高く、酸化ストレスとの関連も指摘されている(49, 50)。また、ノックアウトモデルを用いて、*PAR2* が、PI3K / Akt / mTOR シグナル伝達経路を介してオートファジーを阻害することにより、腎尿細管上皮炎症を誘導することや(51)、*Par2* の欠如が、腎組織の損傷を弱め、炎症、線維症、および酸化ストレスに関連する遺伝子の発現レベルを低下させると報告されている(52)。これらの報告は本研究においても *F2rl1* が低栄養母胎の産仔ラットの高血圧等の表現型の違いに寄与した可能性を示唆している。

### 【本研究の実験限界と今後の検討課題】

本実験で使用したラットの食餌について、低蛋白食自体は蛋白質の比率としては正確に 8% の低蛋白食としたが、そのアミノ酸構成については検討できていない。低蛋白のうちどの物質の欠乏がこの実験に影響を与えたかまでは不明であった。

また、低蛋白食母胎へのタウリン補填によって、産仔ラットの高血圧の是正効果や、EPC 機能の改善効果を認めた。タウリンは成獣となった産仔ラットにおいては、体内での生合成も可能である上、普通食を与えており食餌からの摂取も可能である。そのため本研究のタウリンの作用機序として、個体自身へのタウリン摂取を行った既報とは異なる考察も必要である。胎児期のタウリン不足が、成人期の血圧、EPC 機能に影響を与えており、その変化にはエピジェネティック情報異常の要素が関連した可能性が考えられるが、本研究においてはその考察は困難である。またその観点からすると、母胎や胎仔ラットのタウリン濃度の情報が重要となるが、本研究では測定は行っていない。文献上でも低栄養母胎のタウリン濃度について言及はなかった。一方ラットの肝臓へのタウリンの蓄積量を比較した実験は存在する。それによると非妊娠期のメス成熟ラットの肝臓全体のタウリン含有量が  $46.7 \mu\text{moles}$  であるのに対し、妊娠末期の胎仔の肝臓内のタウリン含有量は  $30.7 \mu\text{moles}$  となり、妊娠ラット一腹あたりの全胎仔のタウリン含量は  $340 \mu\text{moles}$  にもおよび、非妊娠メスラットの 10 倍以上も蓄積されている(8)。推測になるが、この妊娠ラットのタウリン蓄積には体外からの摂取タウリンが不可欠と考えられ、LP 群では妊娠母胎および胎仔ラットのタウリン不足があったと想像されるが実験限界と思われた。

腎臓由来間葉系幹細胞の実験においても、ATAC-seq および RNA-seq の結果をうけて、2 群間で差異を認めた遺伝子について精査したにすぎない。また、ヒストンの化学修飾、クロマチンリモデリング、各種の RNA などによる遺伝子発現制御などの機構によるエピジェネティクスの変化には言及できていない。本研究におけるオープンクロマチン領域の解析は順遺伝学的手法に基づくものであり、これらの遺伝子が単一で表現型の違いに関わっているかどうかは、細胞レベル、可能であれば個体レベルでノックインあるいは、ノックアウトモデルを作成し精査する必要がある。今後は *F2rl1*、*Chac1*、*Tspan6* の遺伝子を遺伝子編集技術 CRISPR/Cas9 によりノックダウンしたラットにて検証していく予定である。

## 【結論】

図 16 に、本研究の結果から推察された胎児期低栄養による腎・血管障害と高血圧の成因に関する因果関係の仮説をまとめた。胎児期低栄養では、産仔で出生児から継続する体重低下を起こした。成獣期には高血圧を発症したが、タウリン投与により予防できた。これらの病態には **LRC** 機能異常での腎臓修復異常による腎障害、**EPC** 機能異常による血管障害が関与することが示唆された。また産仔ラットの腎臓由来 **MSC** は既に間葉細胞により分化していたことより、腎内の **RA** 系の亢進が成獣期の高血圧に関与している可能性が示唆された。

## 【謝辞】

本研究にあたり、研究全般において御指導、御鞭撻いただきました日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野 福田昇教授、日本大学医学部内科学系小児科学分野 森岡一朗教授に心から感謝致します。

エピジェネティクス解析にご協力頂きました千葉大学医学部分子腫瘍学分野 金田篤志教授、岡部篤史助教、腎組織の病理所見の評価にあたりご協力頂きました八戸学院大学健康医療学部人間健康学科 遠藤守人教授に心より感謝申し上げます。また、研究全般を献身的に支え多くの御援助をいただきました日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野 片川まゆみ様にも深く感謝致します。研究全般にわたりご協力いただいた深澤みゆき様、Lan Chen 様、常見明子様、谷口由樹様ほか御協力いただきました皆様に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり協力し支えていただいた、日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野、日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野、日本大学医学部内科学系小児科学分野の皆様には深謝いたします。

【表】

	Contorol群	LP群	LPT群
飼料	標準飼料23%蛋白食 (オリエンタル酵母工業(株)MF)	8%低蛋白食	8%低蛋白食
飲水	普通飲水	普通飲水	3%タウリン水

表 1. 各群の飼料と飲水の比較

Contorol 群：通常食母胎群

LP 群：低蛋白食母胎群

LPT 群：低蛋白食＋タウリン補充母胎群

栄養成分名	Control	Low Protein
粗タンパク (g)	23.1	8.07
タウリン (mg)	25	0
粗脂肪 (g)	5.1	5.1
粗灰分 (g)	5.8	3.1
粗繊維 (g)	2.8	5.0
NFE (糖質) (g)	55.3	69.8
Ca (g)	1.07	0.56
P (g)	0.83	0.31
Mg (g)	0.24	0.05
Na (g)	0.19	0.10
K (g)	0.90	0.36
総エネルギー (kcal)	359	357
タンパクエネルギー比 (%)	25.7	9.0
NEFエネルギー比 (%)	61.6	78.1

**表 2. 8%低蛋白食の栄養成分 (100g 中)**

NFE : Nitrogen Free Extracts (可溶無窒素物 : 糖質)



Distance to TSS	Gene Name	ATAC-seq C	ATAC-seq LP	RNA-seq C	RNA-seq LP
-192	F2rl1	20.03	43.55	1.808961602	2.764152916
477	Chac1	25.04	67	3.499820381	4.240703575
38	Tspan6	20.03	40.2	6.417903135	7.122631309
279	Kcnv1	20.03	46.9	0	0
-105	LOC499643	25.04	60.3	0	0
-85	Snhg11	25.04	50.25	0	0
68	Phf11b	40.07	103.85	0.094246341	0
-178	Slc30a7	60.1	137.34	4.190148635	4.075977522
-5	Lix1l	20.03	53.6	5.57315636	5.44968352
112	Ica1	25.04	67	3.348437816	3.214449686
-207	Cdk18	30.05	60.3	3.032843164	2.814499154
-223	Abhd4	20.03	43.55	5.879291618	5.588339861
-182	Adamts2	20.03	46.9	3.786847244	3.423773117
26	Sp4	20.03	50.25	1.791701568	1.41219078
68	B3galnt1	20.03	40.2	4.561998138	4.078157214
36	Sema4b	25.04	50.25	2.282629582	1.702391584
-447	Nudt7	20.03	60.3	2.765963248	2.164113679

**表 3. RNA シーケンシング 解析 (RNA-seq) と Assay for Transposase-Accessible Chromatin (ATAC) シーケンシング 解析 (ATAC-seq) の統合解析結果**

RNA-seq と ATAC-seq の結果より、正常食母胎 (C) 群と低蛋白食母胎 (LP) 群の産仔ラットの腎臓由来間葉系幹細胞 (MSC) のエピジェネティックな差異に寄与している可能性のある候補遺伝子を抽出した。

TSS : transcriptional start site (転写開始点)

【図】

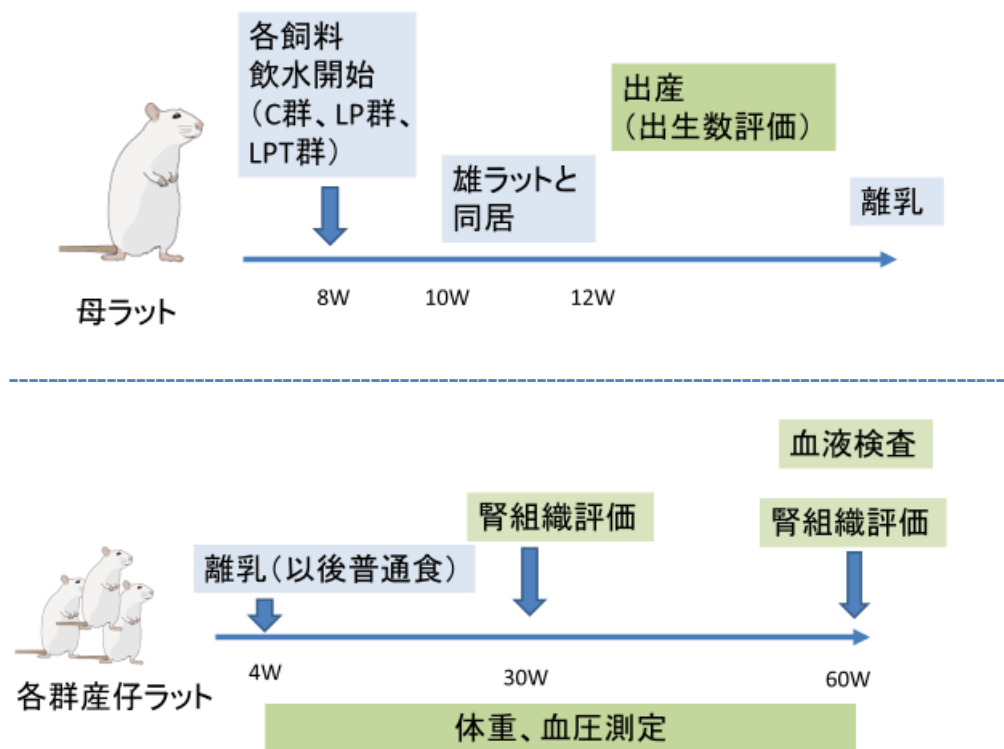
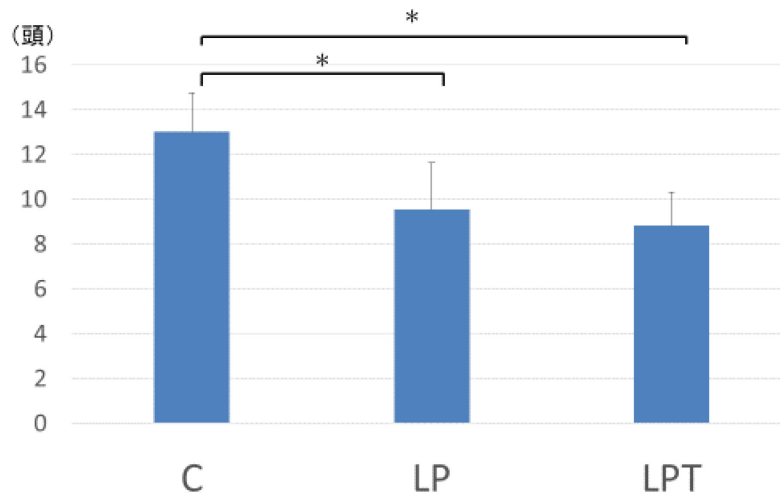


図 1. 実験プロトコールの流れ

C 群：正常食母胎群

LP 群：低蛋白食母胎群

LPT 群：低蛋白食+タウリン補充母胎群



**図 2. 各群の産仔ラットの 1 母胎あたりの産仔ラットの出生数**

正常食母胎 (C) 群の産仔ラットの 1 母胎あたりの出生数は低蛋白食母胎 (LP) 群、低蛋白食+タウリン補充 (LPT) 群の産仔ラットに対してそれぞれ有意に多かった。LP 群と LPT 群の産仔ラット間では差は認めなかった。グラフは平均値±標準誤差 (母胎正常栄養 (C) 群は n=3、LP 群、LPT 群は n=6) で示している。\*P<0.05。

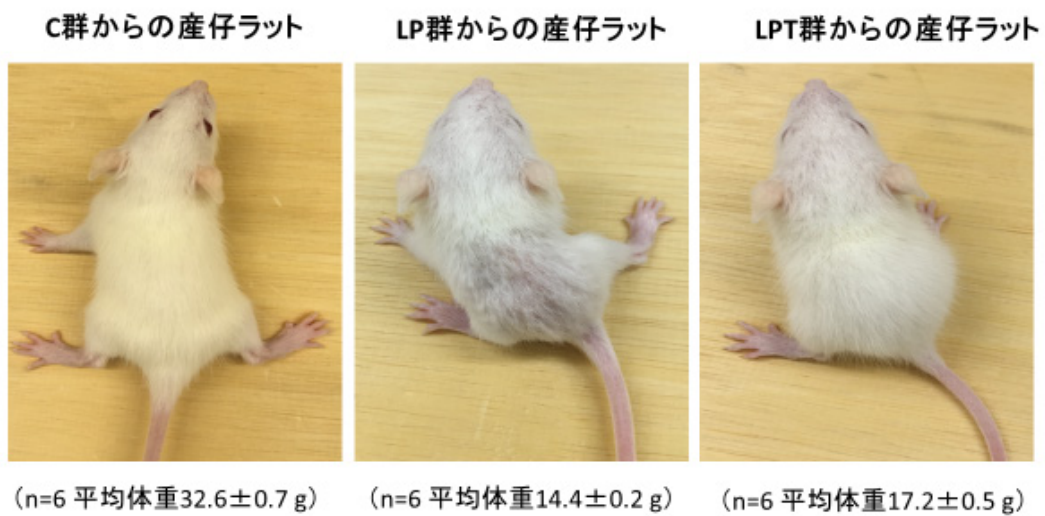


図 3. 各群産仔ラットの外観 (3 週齢)

正常食母胎 (C) 群、低蛋白+タウリン補充母胎 (LPT) 群と比較し、低蛋白母胎 (LP) 群の産仔ラットでは体毛がまばらで、毛並みも悪かった。以後成長とともに体毛の量は他群と同等となったが、毛並みの悪さは持続した。

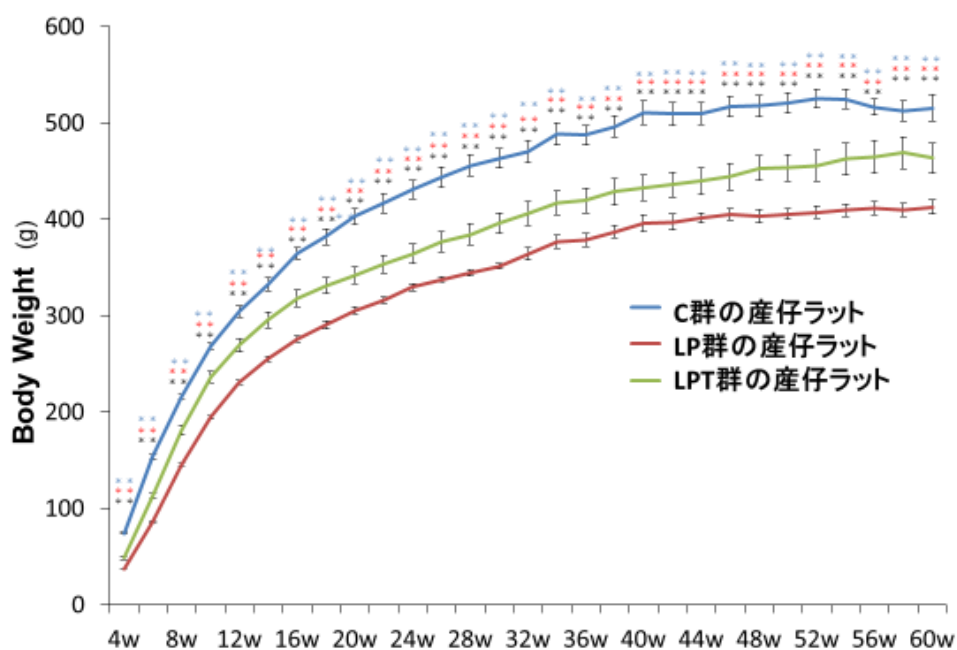


図 4. 各群産仔ラットの体重の推移

出生後一貫して有意差を持って、正常食母胎（C）群、低蛋白食+タウリン補充母胎（LPT）群、低蛋白食母胎（LP）群の産仔ラットの順で重量が多かった。グラフは平均値±標準誤差（n=6）で示している。

\* \* LPT 群の産仔ラット vs. C 群の産仔ラット  $P<0.01$ 。

\* \* LP 群の産仔ラット vs. C 群の産仔ラット  $P<0.01$ 。

\* \* LP 群の産仔ラット vs. LPT 群の産仔ラット  $P<0.01$ 。

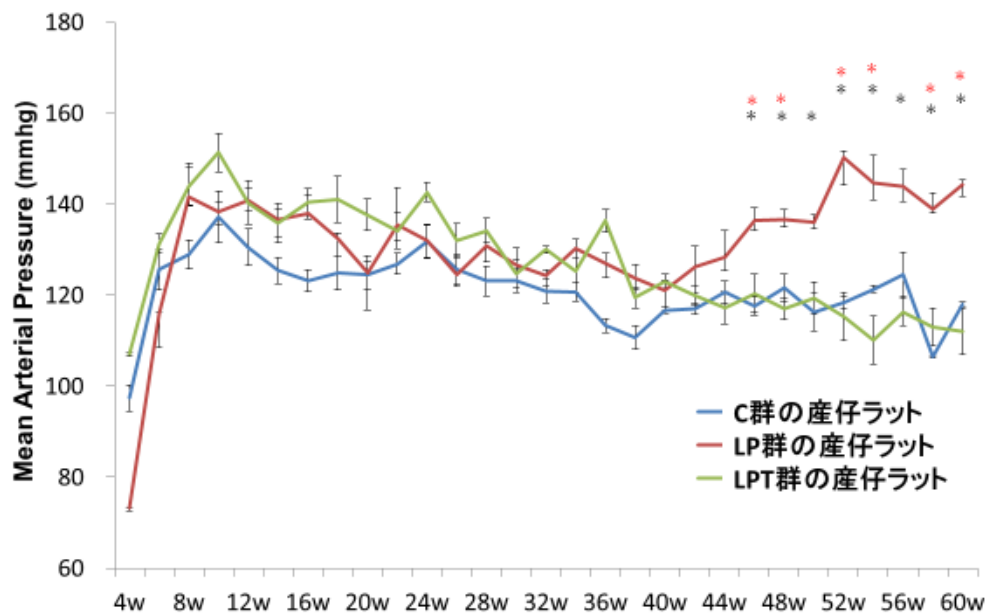


図 5. 各群産仔ラットの血圧の推移

成獣となった 44 週齢以降、正常食母胎（C）群および低蛋白食＋タウリン補充母胎（LPT）群の産仔ラットと比較して、低蛋白食母胎（LP）群の産仔ラットは有意に高値であった。一方で LPT 群と C 群の産仔ラットを比較すると有意差を認めなかった。グラフは平均値±標準誤差（n=6）で示している。

\* LP 群の産仔ラット vs. C 群の産仔ラット  $P < 0.05$ 。

\* LP 群の産仔ラット vs. LPT 群の産仔ラット  $P < 0.05$ 。

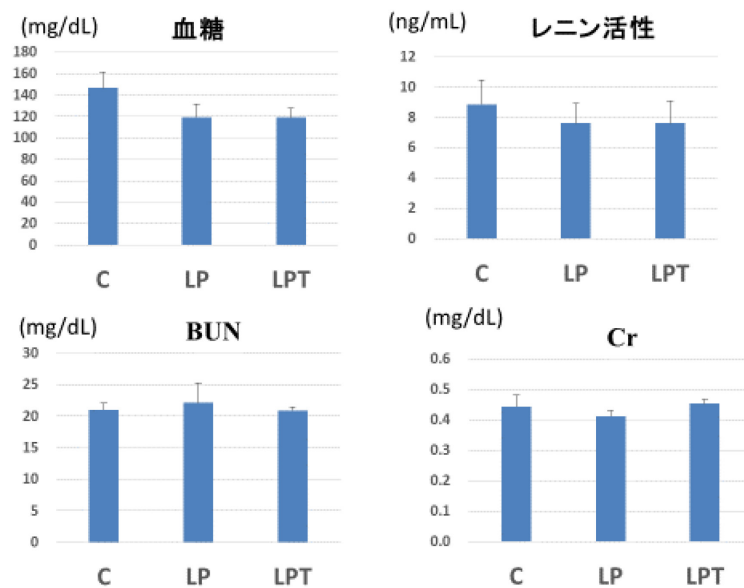


図 6. 正常食母胎栄養 (C) 群、低蛋白食母胎 (LP) 群、低蛋白食+タウリン補充母胎 (LPT) 群の産仔ラットの 60 週齢での血液検査結果

空腹時採血を行った。血糖値、血漿レニン活性、血清尿素窒素 (BUN)、血清クレアチニン (Cr) において、各群に有意差は認めなかった。グラフは平均値±標準誤差 (n=6) で示している。

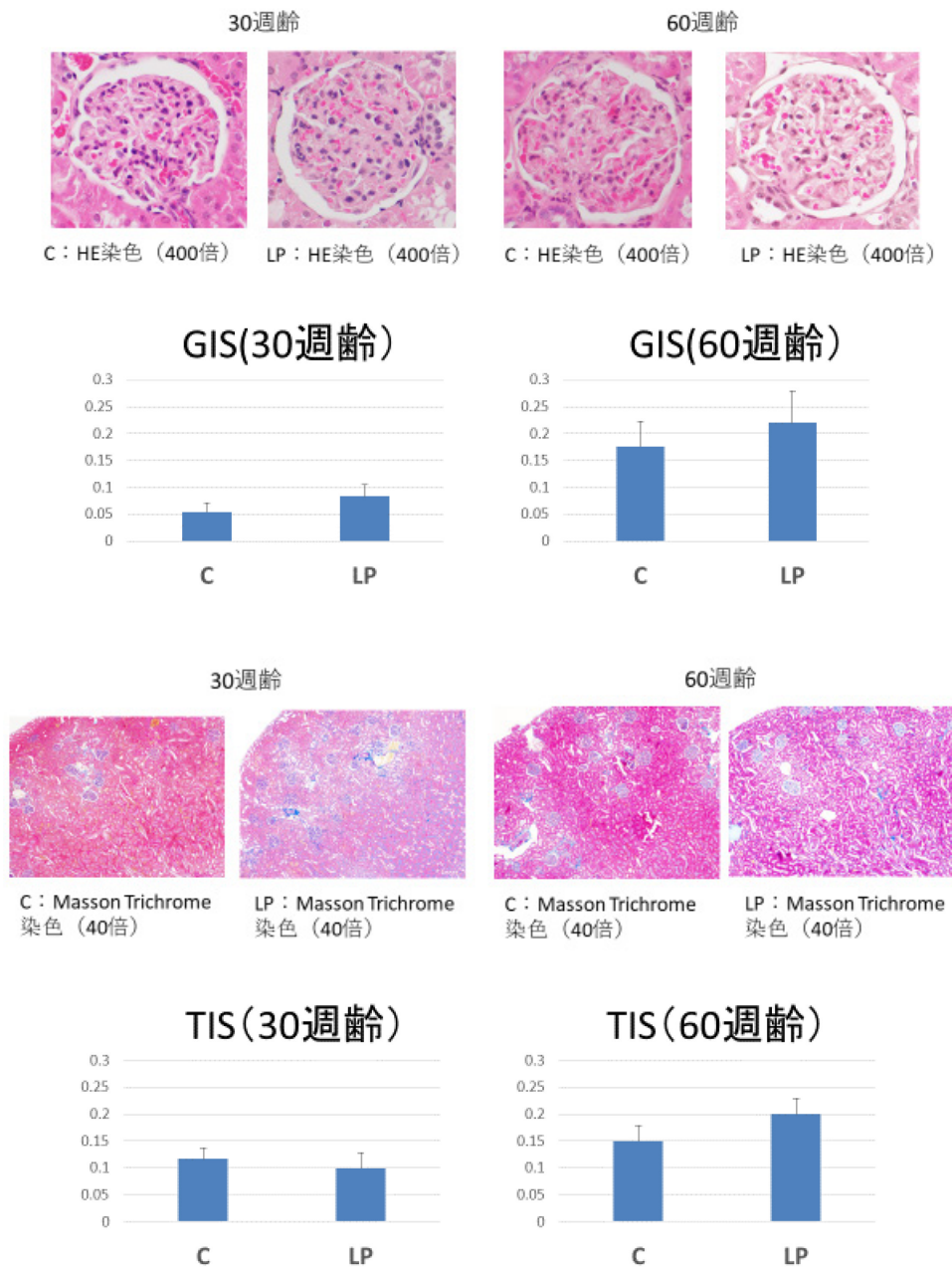


図 7. 産仔ラットの腎臓病理組織像と GIS、TIS の評価（正常食母胎（C）群 V.S. 低蛋白食母胎（LP）群の産仔ラット）

30 週齢、60 週齢の C 群（各々n=3）、LP 群（各々n=3）の産仔ラットの腎臓病理組織を比較した。それぞれの週齢において、HE 染色および Masson Trichrome 染色で確認し、GIS と TIS の評価をした。いずれの週齢においても 2 群間の障害指数に有意差はなかったが、LP 群の産仔ラットの方が、組織障害度が強い傾向にあった。グラフは平均値±標準誤差で示している。

GIS : Glomerular injury score、TIS : tubulointerstitial injury score。



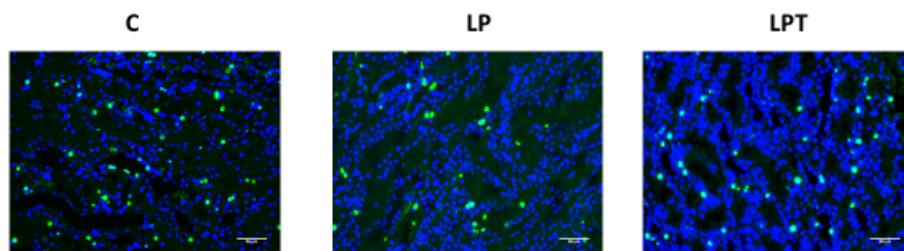


図 8. 14 週齢の正常食母胎（C）群、低蛋白食母胎（LP）群、低蛋白食＋タウリン補充母胎（LPT）群の各群産仔ラットの虚血再灌流腎の Brdu 陽性細胞の免疫染色

拡大倍率 200 倍である。青色で染色された部位が 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) にて染色された細胞核であり、緑色に染色された部位が BrdU 陽性細胞である。BrdU 陽性の LRC は各群とも遠位および近位尿細管の核に局在していた。

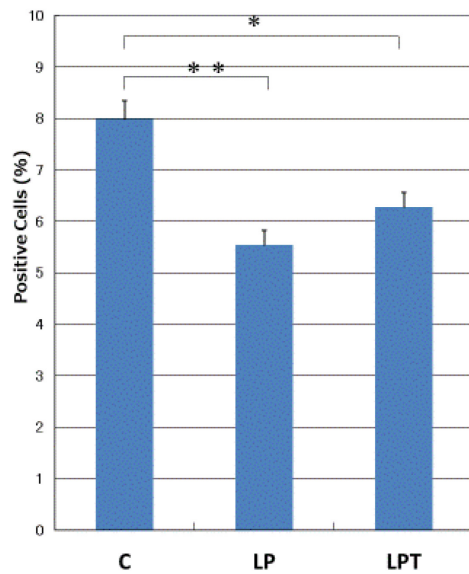


図 9. 14 週齢の正常食母胎 (C) 群、低蛋白食母胎 (LP) 群、低蛋白食+タウリン補充母胎 (LPT) 群の各群産仔ラットの虚血再灌流腎の Brdu 陽性細胞数

Brdu 陽性細胞数を 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色陽性細胞数で補正し、各群 n=3、それぞれ 5 視野の計 15 視野で比較した。C 群と比較して LP 群、LPT 群の産仔ラットでは有意に陽性細胞数は有意に減少した。LPT 群では LP 群の産仔ラットに比しやや増加していたが、有意差はなかった。グラフは平均値±標準誤差で示している。

\*\* P<0.01、\* P<0.05。

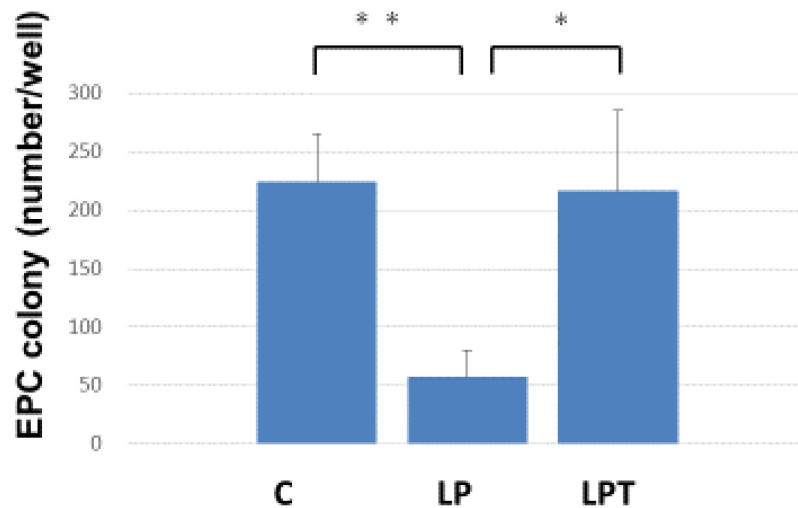
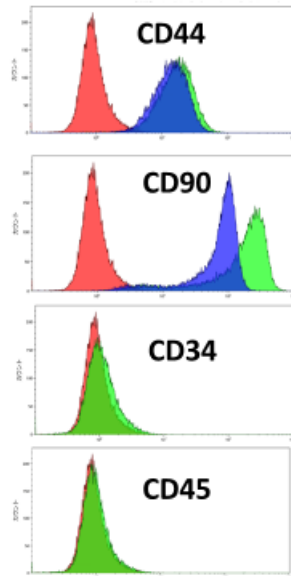


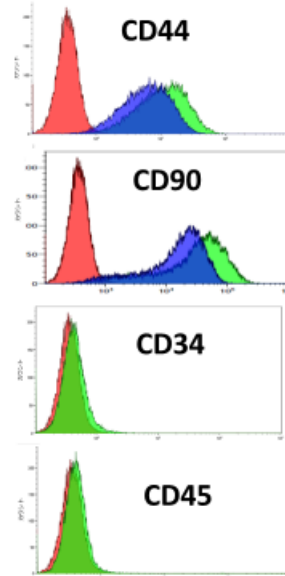
図 10. 60 週齢における正常食母胎（C）群、低蛋白食母胎（LP）群、低蛋白食+タウリン補充母胎（LPT）群の各群産仔ラットの血管内皮前駆細胞（EPC）コロニー数

各群について培養後、colony 数を 4well/sample カウントし、1well の平均値を算出し、EPC 機能を評価した。いずれの週齢においても、LP 群の産仔ラットは C 群および LPT 群の産仔ラットと比較し有意な EPC コロニー数の減少、つまり機能低下を認めた。C 群および LPT 群の産仔ラットを比較すると有意差はなかった。n=6、グラフは平均値±標準誤差で示している。\*\* P<0.01、\*P<0.05。

**C群からの産仔ラットの  
腎臓由来MSC**



**LP群からの産仔ラットの  
腎臓由来MSC**



**図 11. 14 週齢の正常食母胎（C）群、低蛋白食母胎（LP）群の産仔ラットの腎臓から単離培養した腎臓由来間葉系幹細胞（MSC）のフローサイトメトリー**

図中の赤色は Negative Control の結果を、青色は抗体濃度  $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、緑色は抗体濃度  $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  での結果を示した。

両群ともに CD44 および 90 の陽性を、CD34 および 45 の陰性を両群とも示しており、腎臓由来 MSC であると確認した。

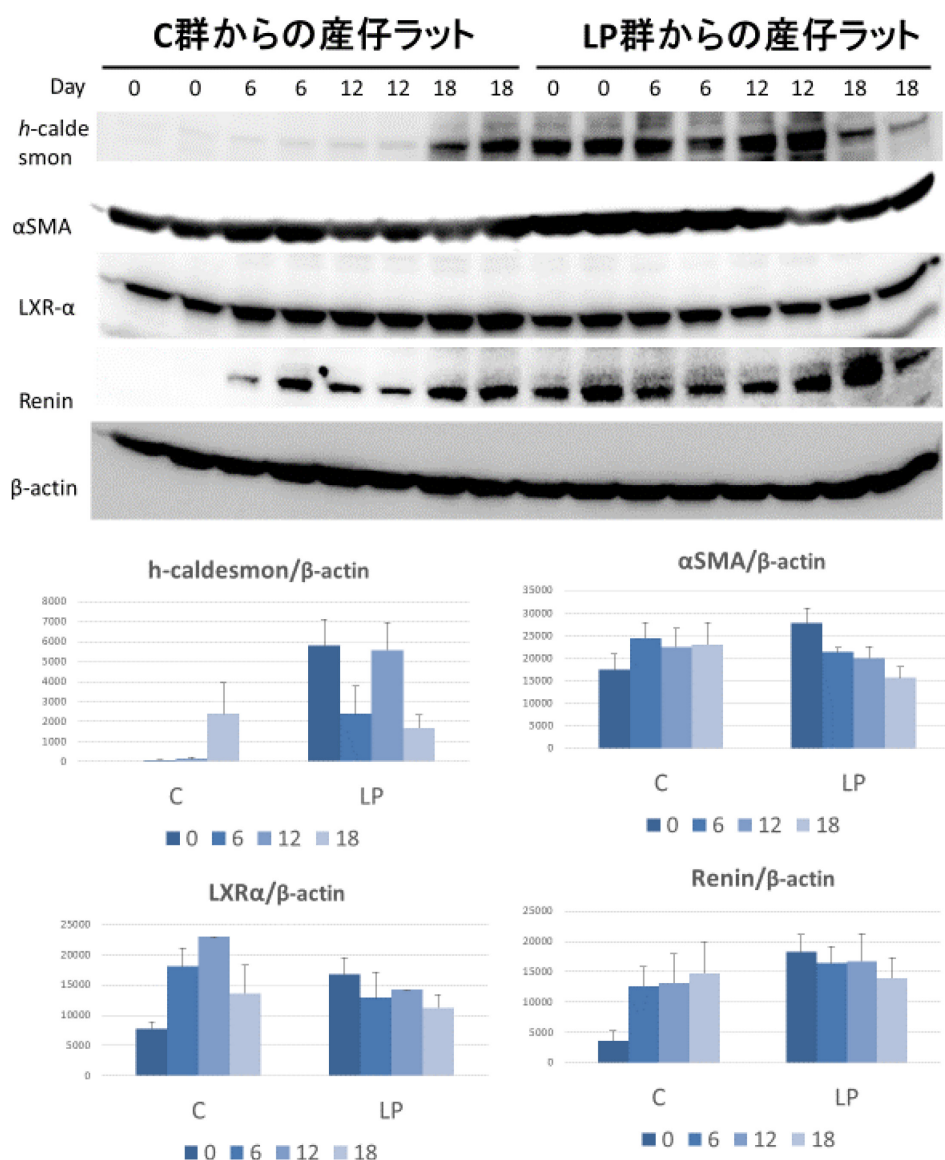
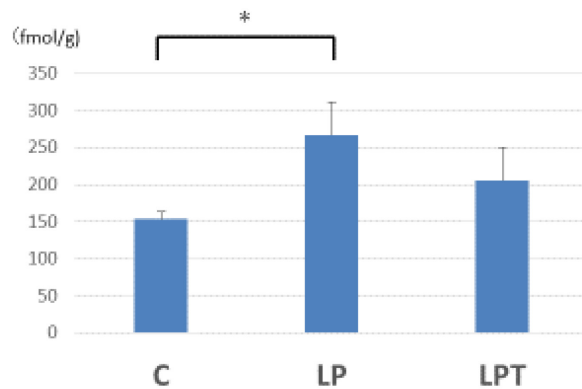


図 12. 腎臓由来間葉系幹細胞（MSC）の TGF-β1 によるメサンジウム細胞への分化

腎臓由来 MSC の TGF-β による細胞分化をウエスタンブロット解析にて経時的に評価した。上図の左側に正常食母胎（C）群の、右側に低蛋白食母胎（LP）群の産仔ラットの腎臓由来 MSC を、それぞれ TGF-β1 による分化過程を day0、6、12、18 と経時的にならべた。LP 群からの産仔ラットの腎臓由来間葉系幹細胞では、C 群の産仔ラットの腎臓由来 MSC と比較して h-caldesmon、αSMA が早期から発現し、間葉細胞に早く分化したことが示された。また転写 LXR-α も高く、これによりレニンの発現も高かった。計 3 回同様の手法で実験を行い、ウエスタンブロット解析の結果をを定量化したものを下図に示すが、再現性を持って同様の結果を得た。

h-caldesmon : heavy caldesmon, α SMA : alpha-smooth muscle actin,

LXR α : liver X receptor-α



**図 13. 60 週齢の各群産仔ラットにおける腎内アンジオテンシン II (Ang II) 測定**

正常食母胎 (C) 群の産仔ラットと比較して低蛋白食母胎 (LP) 群の産仔ラットでは腎内 Ang II が有意 ( $P < 0.05$ ) に増加していた。C 群と低蛋白食 + タウリン補充 (LPT) 群の産仔ラット、LP 群と LPT 群の産仔ラット間には有意差は認めなかった。

グラフは平均値 ± 標準誤差 (n=5) で示している。\*  $P < 0.05$ 。

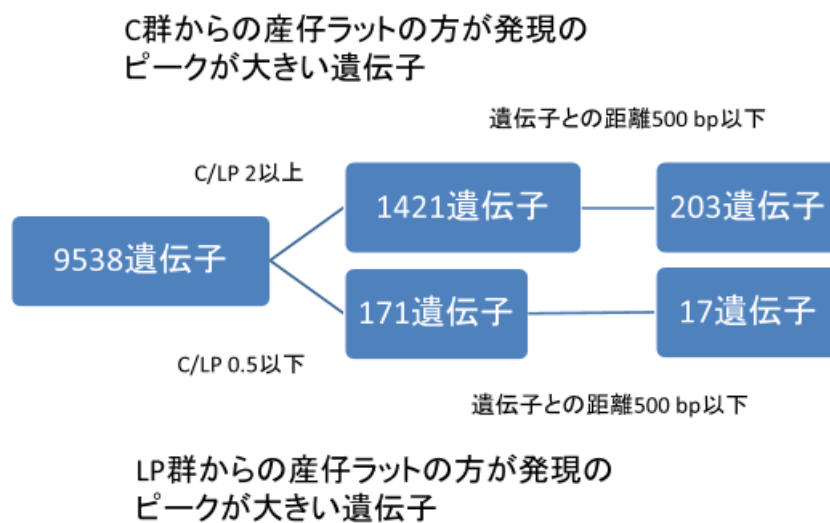


図 14. 腎臓由来間葉系幹細胞(MSC)の Assay for Transposase-Accessible Chromatin (ATAC) シーケンシング 解析 (ATAC-seq)の解析

2 群間で活性化のピークの差が大きい遺伝子で、さらに特に転写制御領域とその標的遺伝子の距離が近い領域、つまりより関与が大きいと考えられる遺伝子を選んだ。正常食母胎 (C) 群の方が低蛋白食 (LP) 群の産仔ラットの 2 倍以上発現のピークが大きい領域と関連する遺伝子 1421 遺伝子のうち、転写制御領域と標的遺伝子の距離が 500 bp 以下と近い遺伝子はうち 203 遺伝子認めた。一方で LP 群の方が C 群の産仔ラットの 2 倍以上発現のピークが大きい領域と関連する遺伝子 171 遺伝子のうち、転写制御領域と標的遺伝子の距離が 500 bp 以下と近い遺伝子はうち 17 遺伝子認めた。

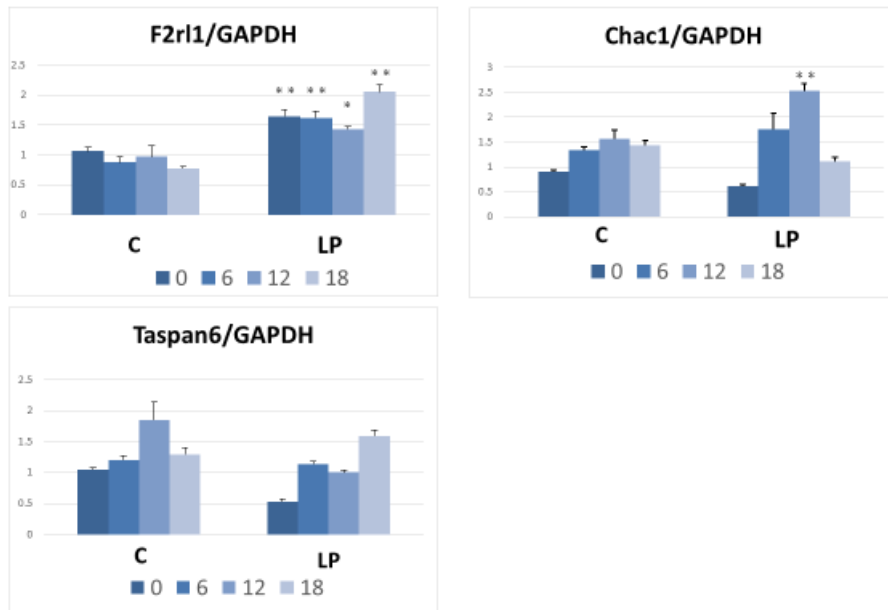


図 15. 腎由来間葉系幹細胞（MSC）の細胞分化過程の real time PCR

*F2rl1*、*Chac1*、*Tspan6* について腎臓由来 MSC の TGF- $\beta$ 1 によるメサンジウム細胞への分化過程における発現をリアルタイム RT-PCR で評価した。*F2rl1* においては細胞の分化前、分化過程においても一貫して低蛋白食母胎（LP）群の方が正常食母胎（C）群の産仔ラット由来に腎臓由来 MSC において有意に上昇していた。*Chac1* や *Tspan6* では明らかな傾向を認めなかった。\* \*  $P < 0.01$ 、\*  $P < 0.05$ 。



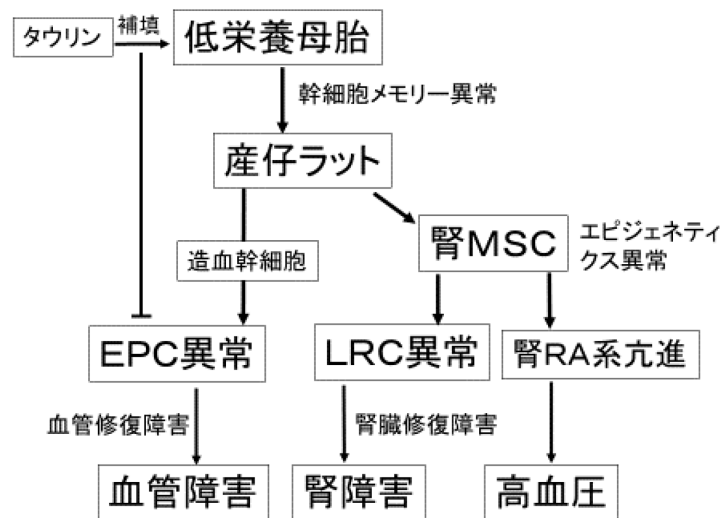


図 16. 本研究の結果から推察された低栄養母体による腎・血管障害と高血圧の成因に関する因果関係仮説

EPC：血管内皮前駆細胞

LRC：Label-retaining cells

RA 系：レニン-アンジオテンシン系

## 【引用文献】

1. 厚生労働省政策統括官（統計・情報政策担当）．平成 30 年我が国の人口動態—平成 28 年までの動向—．2018.
2. Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*. 1986;1(8489):1077-81.
3. Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science*. 2004;305(5691):1733-6.
4. Barker DJ. Obesity and early life. *Obes Rev*. 2007;8 Suppl 1:45-9.
5. Navarrete A, van Schaik CP, Isler K. Energetics and the evolution of human brain size. *Nature*. 2011;480(7375):91-3.
6. Vehaskari VM, Aviles DH, Manning J. Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney Int*. 2001;59(1):238-45.
7. 山口賢次．タウリンを中心とした含硫アミノ酸の代謝と栄養．*化学と生物*. 1985;23(5):299-308.
8. 赤堀周一郎、江尻孝平、工藤尚文、関場香、赤木玲子、産賀敏彦．ラット胎仔および新生仔の発育過程におけるタウリンおよびその他の含硫アミノ酸濃度の変動．*日本産科婦人科学会雑誌*. 1984;36(3):384-90.
9. Kuo SM, Stipanuk MH. Changes in cysteine dioxygenase and cysteinesulfinate decarboxylase activities and taurine levels in tissues of pregnant or lactating rat dams and their fetuses or pups. *Biol Neonate*. 1984;46(5):237-48.
10. Sturman JA, Rassin DK, Gaull GE. Taurine in developing rat brain: maternal-fetal transfer of [35 S] taurine and its fate in the neonate. *J Neurochem*. 1977;28(1):31-9.
11. van Gelder NM, Parent M. Protein and taurine of maternal diets during the mouse neonatal period: permanent effects on cerebellar--brainstem amino acid levels in mature offspring. *Neurochem Res*. 1982;7(8):987-98.
12. Tang C, Marchand K, Lam L, Lux-Lantos V, Thyssen SM, Guo J, et

- al. Maternal taurine supplementation in rats partially prevents the adverse effects of early-life protein deprivation on beta-cell function and insulin sensitivity. *Reproduction*. 2013;145(6):609-20.
13. Yamori Y, Taguchi T, Mori H, Mori M. Low cardiovascular risks in the middle aged males and females excreting greater 24-hour urinary taurine and magnesium in 41 WHO-CARDIAC study populations in the world. *Journal of Biomedical Science*. 2010;17.
14. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114(6):763-76.
15. Kitamura S, Yamasaki Y, Kinomura M, Sugaya T, Sugiyama H, Maeshima Y, et al. Establishment and characterization of renal progenitor like cells from S3 segment of nephron in rat adult kidney. *FASEB J*. 2005;19(13):1789-97.
16. Rezza A, Sennett R, Rendl M. Adult stem cell niches: cellular and molecular components. *Curr Top Dev Biol*. 2014;107:333-72.
17. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008;132(4):598-611.
18. Woo M, Isganaitis E, Cerletti M, Fitzpatrick C, Wagers AJ, Jimenez-Chillaron J, et al. Early life nutrition modulates muscle stem cell number: implications for muscle mass and repair. *Stem Cells Dev*. 2011;20(10):1763-9.
19. Wang H, Gomez JA, Klein S, Zhang Z, Seidler B, Yang Y, et al. Adult renal mesenchymal stem cell-like cells contribute to juxtaglomerular cell recruitment. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(8):1263-73.
20. Maeshima A. Label-retaining cells in the kidney: origin of regenerating cells after renal ischemia. *Clin Exp Nephrol*. 2007;11(4):269-74.
21. Yamashita S, Maeshima A, Nojima Y. Involvement of renal progenitor tubular cells in epithelial-to-mesenchymal transition in fibrotic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(7):2044-51.

22. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 1998;92(2):362-7.
23. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003;348(7):593-600.
24. Cheloufi S, Elling U, Hopfgartner B, Jung YL, Murn J, Ninova M, et al. The histone chaperone CAF-1 safeguards somatic cell identity. *Nature*. 2015;528(7581):218-24.
25. Yu VWC, Yusuf RZ, Oki T, Wu J, Saez B, Wang X, et al. Epigenetic Memory Underlies Cell-Autonomous Heterogeneous Behavior of Hematopoietic Stem Cells. *Cell*. 2016;167(5):1310-22 e17.
26. Yang C, Tibbitt MW, Basta L, Anseth KS. Mechanical memory and dosing influence stem cell fate. *Nat Mater*. 2014;13(6):645-52.
27. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(5 Suppl):1344S-52S.
28. Hortovanyi E, Varbiro S, Tokes AM, Illyes G, Szekacs B, Paku S, et al. Connexin 43 expression in rat aortic smooth muscle after ovariectomy and hormonal replacement. *Pathol Res Pract*. 2001;197(2):109-12.
29. Sabbatini M, Vitaioli L, Baldoni E, Amenta F. Nephroprotective effect of treatment with calcium channel blockers in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;294(3):948-54.
30. Maeshima A, Yamashita S, Nojima Y. Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(12):3138-46.
31. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2009;10(1):57-63.
32. Buenrostro JD, Giresi PG, Zaba LC, Chang HY, Greenleaf WJ. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat Methods*. 2013;10(12):1213-8.

33. Snoeck A, Remacle C, Reusens B, Hoet JJ. Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate*. 1990;57(2):107-18.
34. Langley SC, Jackson AA. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Lond)*. 1994;86(2):217-22; discussion 121.
35. Nishina H, Green LR, McGarrigle HH, Noakes DE, Poston L, Hanson MA. Effect of nutritional restriction in early pregnancy on isolated femoral artery function in mid-gestation fetal sheep. *J Physiol*. 2003;553(Pt 2):637-47.
36. Hultman K, Alexanderson C, Manneras L, Sandberg M, Holmang A, Jansson T. Maternal taurine supplementation in the late pregnant rat stimulates postnatal growth and induces obesity and insulin resistance in adult offspring. *J Physiol*. 2007;579(Pt 3):823-33.
37. Fujigaki Y, Goto T, Sakakima M, Fukasawa H, Miyaji T, Yamamoto T, et al. Kinetics and characterization of initially regenerating proximal tubules in S3 segment in response to various degrees of acute tubular injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(1):41-50.
38. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360(9331):427-35.
39. Yu Y, Fukuda N, Yao EH, Matsumoto T, Kobayashi N, Suzuki R, et al. Effects of an ARB on endothelial progenitor cell function and cardiovascular oxidation in hypertension. *Am J Hypertens*. 2008;21(1):72-7.
40. Yao EH, Fukuda N, Matsumoto T, Katakawa M, Yamamoto C, Han Y, et al. Effects of the antioxidative beta-blocker celiprolol on endothelial progenitor cells in hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 2008;21(9):1062-8.
41. Yao EH, Fukuda N, Matsumoto T, Kobayashi N, Katakawa M, Yamamoto C, et al. Losartan improves the impaired function of endothelial

progenitor cells in hypertension via an antioxidant effect. *Hypertens Res.* 2007;30(11):1119–28.

42. Oliveira V, de Souza LV, Fernandes T, Junior SDS, de Carvalho MHC, Akamine EH, et al. Intrauterine growth restriction-induced deleterious adaptations in endothelial progenitor cells: possible mechanism to impair endothelial function. *J Dev Orig Health Dis.* 2017;8(6):665–73.

43. Katakawa M, Fukuda N, Tsunemi A, Mori M, Maruyama T, Matsumoto T, et al. Taurine and magnesium supplementation enhances the function of endothelial progenitor cells through antioxidation in healthy men and spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2016;39(12):848–56.

44. Zhao L, Hantash BM. TGF- $\beta$ 1 regulates differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Vitam Horm.* 2011;87:127–41.

45. Matsushita K, Morello F, Wu Y, Zhang L, Iwanaga S, Pratt RE, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into renin-producing juxtaglomerular (JG)-like cells under the control of liver X receptor- $\alpha$ . *J Biol Chem.* 2010;285(16):11974–82.

46. Chen L, Fukuda N, Shimizu S, Kobayashi H, Tanaka S, Nakamura Y, et al. Role of complement 3 in renin generation during the differentiation of mesenchymal stem cells to smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020;318(5):C981–C90.

47. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature.* 2007;447(7143):396–8.

48. Cicala C. Protease activated receptor 2 and the cardiovascular system. *Br J Pharmacol.* 2002;135(1):14–20.

49. Yau MK, Liu L, Fairlie DP. Toward drugs for protease-activated receptor 2 (PAR2). *J Med Chem.* 2013;56(19):7477–97.

50. Ando M, Matsumoto T, Kobayashi S, Iguchi M, Taguchi K, Kobayashi T. Impairment of Protease-Activated Receptor 2-Induced Relaxation of Aortas of Aged Spontaneously Hypertensive Rat. *Biol Pharm Bull.* 2018;41(5):815–9.

51. Du C, Zhang T, Xiao X, Shi Y, Duan H, Ren Y. Protease-activated

receptor-2 promotes kidney tubular epithelial inflammation by inhibiting autophagy via the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway. *Biochem J.* 2017;474(16):2733-47.

52. Hayashi S, Oe Y, Fushima T, Sato E, Sato H, Ito S, et al. Protease-activated receptor 2 exacerbates adenine-induced renal tubulointerstitial injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;483(1):547-52.

## 研究業績

清水 翔一

I	発表	①一般発表	21 (共 3)
		②特別発表	1
II	論文	①原著論文	1 (共 1)
		②症例報告	4 (共 2)
		③総説	1
III	著書		1

以上



## I 発表

### ① 一般発表

1. 大島正成, 諸橋環, 清水翔一, 齋藤宏, 高橋昌里 : 膀胱内に限局した巨大尿酸結石を認めた 1 小児例 : 第 120 回日本小児科学会総会学術集会, 東京, 2017 年 4 月
2. Shoichi Shimizu, Tamaki Morohashi, Yuno Takahashi, Hiroshi Saito, Shori Takahashi : A case of nephrotic syndrome associated with renovascular hypertension : The 15th Korea-China-Japan Pediatric Nephrology Seminar, Tokyo, 2017. 4
3. 清水翔一, 諸橋環, 高橋悠乃, 高橋昌里 : 急性巣状細菌性腎炎と急性腎盂腎炎の比較 : 第 52 回日本小児腎臓病学会, 東京, 2017 年 6 月
4. 大島 正成, 清水 翔一, 諸橋 環, 高橋 悠乃, 高橋 昌里 : 腎不全発症し急性尿細管間質性腎炎とネフローゼ症候群を併発した IgA 腎症の 1 例 : 第 39 回日本小児腎不全学会学術集会, 兵庫, 2017 年 9 月

5. Shoichi Shimizu, Tamaki Morohashi, Yuno Takahashi, Hiroshi Saito, Shori Takahashi : Clinical implication of fractional excretion of total protein as an accurate indicator of heavy proteinuria : 13th Asian Congress of Pediatric Nephrology in conjunction with the 39th Malaysian Paediatric Association Annual Congress, Kuala Lumpur, Malaysia, 2017. 10
6. 野崎千央, 西村光司, 権高恩, 三浦航, 清水翔一, 吉田圭, 諸橋環, 高橋昌里 : 治療介入直前まで全身状態が保たれていた遅発型 GBS 感染症の 1 例 : 第 643 回日本小児科学会東京都地方会懇話会, 東京, 2018 年 2 月
7. Tamaki Morohashi, Naohiro Wada, Sakiko Odaira, Shoichi Shimizu, Shori Takahashi : Trial of  $\beta$ 2-microglobulin measurement using dried urine spots for CAKUT screening in 3-year-old children : The 16th Japan-Korea-China- Pediatric Nephrology Seminar, Busan, Korea, 2018. 4
8. 藤澤惇平, 清水翔一, 西村光司, 武藤智和, 河村研吾, 諸橋環, 澤田奈実, 桑名司, 木下浩作, 高橋昌里 : 市中感染型 MRSA により発症した急性喉頭蓋炎の 1 例 : 第 121 回日本小児科学会総会学術集会, 福岡, 2018 年 4 月
9. 諸橋環, 和田尚弘, 清水翔一, 高橋昌里 : ろ紙法尿中  $\beta$ 2 マイクログロブリン

ン測定による3歳児検尿での先天性腎尿路障害スクリーニング：第53回小児腎臓病学会学術集会，福島，2018年6月

10. 清水翔一，諸橋環，高橋悠乃，高橋昌里：学校検尿で発見され軽微な尿所見にも関わらず進行したIgA腎症像を呈した一例：第53回小児腎臓病学会学術集会，福島，2018年6月
11. 清水翔一，諸橋環，谷ヶ崎博，高橋昌里，森岡一朗：胃原発リンパ腫に対する自家骨髄移植後に移植関連血栓性微小血管障害，急性腎不全を来した一例：第40回日本小児腎不全学会学術集会，宮崎，2018年11月
12. 清水翔一，福田昇，片川まゆみ，Lan Chen，深澤みゆき，金田篤志，諸橋環，阿部雅紀，森岡一朗：胎児期低栄養での組織幹細胞異常による成人期腎障害および高血圧発症の可能性の検討：第54回高血圧関連疾患モデル学会学術総会，熊本，2018年12月
13. Shoichi Shimizu，Tamaki Morohashi，Yuno Takahashi，Hiroshi Yagasaki，Shori Takahashi，Ichiro Morioka：A case report of NYH9-related disorders associated IgA nephropathy：The 17th Japan-Korea-China Pediatric Nephrology Seminar，Hangzhou,China, 2017. 4
14. 清水翔一，諸橋環，片山大地，秋本卓哉，今泉隆行，岩間元子，阿部百合

- 子，武藤智和，井口梅文，澤田奈実，木下浩作，森岡一朗：Moraxella lacunata 菌血症および急性腎障害を合併した溶連菌感染後急性糸球体腎炎の一例：第 122 回日本小児科学会総会学術集会，金澤，2019 年 4 月
15. 中崎公隆，清水翔一，諸橋環，河村研吾，高橋昌里，森岡一朗：著明な片側腎機能低下を認めたが腎盂形成術で腎摘を回避できた水腎症の 1 例：第 53 回小児腎臓病学会学術集会，大阪，2019 年 6 月
16. 清水翔一，福田昇，片川まゆみ，Lan Chen，深澤みゆき，金田篤志，諸橋環，阿部雅紀，森岡一朗：胎児期低栄養での組織幹細胞異常による成人期腎障害および高血圧発症機序の検討：第 62 回日本腎臓学会学術総会，名古屋，2019 年 6 月
17. 清水翔一，福田昇，片川まゆみ，Lan Chen，深澤みゆき，金田篤志，諸橋環，阿部雅紀，森岡一朗：胎児期低栄養での幹細胞メモリー異常による高血圧発症メカニズム：第 42 回日本高血圧学会総会，東京，2019 年 10 月
18. 清水翔一，諸橋環，高橋昌里，森岡一朗：学校検尿を契機に発見された Tubulointerstitial nephritis and uveitis syndrome の一例：第 41 回日本小児腎不全学会学術集会，高知，2019 年 11 月
19. 吳英俊，諸橋環，清水翔一，高橋昌里，森岡一朗：繰り返す嘔吐発作と著

明な高血圧から周期性 ACTH-ADH 放出症候群と診断した 1 例：第 659 回日本小児科学会東京都地方会懇話会，東京，2019 年 12 月

20. 清水翔一，福田昇，片川まゆみ，Lan Chen，深澤みゆき，阿部雅紀，金田篤志，諸橋環，高橋昌里，森岡一朗：胎児期低栄養による腎臓幹細胞のエピジェネティクスの異常が成人期の高血圧発症に与える影響について：第 4 回臨床 DOHaD セミナー，東京，2020 年 1 月

21. 清水翔一，福田昇，片川まゆみ，Lan Chen，深澤みゆき，阿部雅紀，金田篤志，諸橋環，高橋昌里，森岡一朗：胎児期低栄養による成人期腎障害および高血圧発症機序の解明と母胎のタウリン摂取による発症抑制効果の検討：第 63 回日本腎臓学会学術総会，横浜（紙上発表），2020 年 8 月

## ② 特別発表

1. 清水翔一，福田昇，片川まゆみ，深澤みゆき，諸橋環，高橋昌里，金田篤志，阿部雅紀，森岡一朗：胎児期低栄養での幹細胞メモリー異常による腎障害および高血圧発症メカニズム：第 29 回日本循環薬理学会第 55 回高血圧関連疾患モデル学会合同学会（家森賞受賞講演），高松，2019 年 11 月

## II 論文

### ① 原著論文

1. Chen, L, Fukuda, N, Shimizu, S, Kobayashi, H, Tanaka, S, Nakamura, Y, Matsumoto, T, Abe, M: Role of complement 3 in renin generation during the differentiation of mesenchymal stem cells to smooth muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol, 318: C981-C990, 2020.

### ② 症例報告

1. 清水 翔一, 諸橋 環, 高橋 悠乃, 齋藤 宏, 高橋 昌里 : 神経芽腫治療後の腎血管性高血圧症の治療中にネフローゼ症候群を呈した 1 例 : 日本小児高血圧研究会誌 14 巻 1 号 19-23, 2017 年 6 月
2. 大島 正成, 諸橋 環, 清水 翔一, 高橋 悠乃, 高橋 昌里 : 腎不全で発症し急性尿細管間質性腎炎とネフローゼ症候群を併発した IgA 腎症の 1 例 : 日本小児腎不全学会雑誌 38 巻 231-234, 2018 年 7 月
3. 中崎 公隆, 諸橋 環, 清水 翔一, 河村 研吾, 高橋 昌里, 森岡 一朗 : 著明な

片側腎機能低下を認めたが腎盂形成術で腎摘を回避できた水腎症の 1 例：

日本小児腎病学会雑誌 J-STAGE 早期公開 2020 年 7 月 17 日

4. 清水翔一，諸橋環，高橋昌里，森岡一朗：学校検尿を契機に発見された  
Tubulointerstitial nephritis and uveitis syndrome の 1 例：日本小児腎不全学会雑誌 40 巻 206-209，2020 年 7 月

### ③ 総説

1. 清水翔一，高橋昌里：【症候・疾患からみる小児の検査】症候からみる臨床  
検査の進めかた 蛋白尿(血尿を伴わない)：小児科診療 83 巻増刊 142-147，  
2020 年 4 月

## III 著書

清水翔一，高橋昌里：小児 AKI，（阿部雅紀編）AKI 急性腎障害治療の実際 第 2 章 11，pp135-142，日本医事新報社，東京，2018