

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
(要約)

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

【研究の背景】

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(1)。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(2)。一方、妊娠中低栄養で特に胎児の発達で必須栄養素の一つであ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ことも知られている(3, 4)。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、腎臓など成人の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、最近腎臓にもネフロンS3セグメントには腎臓由来幹細胞(5)の存在が報告された。これらの幹細胞は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(6)、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傷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(7)。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。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(8)。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。

血管内皮前駆細胞（EPC）は骨髄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(9)。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(10)。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(11, 12)。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(13)。この様に胎生期に低栄養で臓器形成を余儀なき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。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(14)。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、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した。

【研究方法】

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）。8 週齢のメス Wistar ラットを、正常食母胎群（C 群）と胎児期低栄養として低蛋白食母胎群（LP 群）に分けた。C 群には通常食、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低蛋白食＋タウリン補充母胎群（LPT 群）に分け、両群とも 8 週齢から蛋白質含有量を 8%にした低蛋白食を与え、LP 群には通常飲水、LPT 群には 3%タウリン水を与えた。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。60 週齢まで観察し、2 週に一度体重測定と tail-cuff 法にて血圧測定を行った。また 30、60 週齢で糸球体障害指数(Glomerular Injury Scores: GIS)と尿細管間質障害指数(Tubular Injury Scores: TIS)の評価を行った(15)。

さらに、虚血再灌流腎の LRC の検出を Maeshima らの方法(16)に基づき、11 週齢の各群産仔ラットに、BrdU を 1 週間腹腔投与し、その 2 週間後に右腎を摘

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、24時間後に左腎切除し、蛍光免疫染色を行いBrDU陽性細胞にてLRCの検出を行った。続いて、EPC機能評価を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、培養し行った。

Wangらの方法(17)に基づき腎臓由来MSCの単離・培養・確認を行った。C群、LP群の14週齢の産仔ラットの腎臓から、CD44陽性細胞を単離し培養を続けた。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を行い、腎臓由来MSCを確認した。腎臓由来MSCに対して、Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)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て、それぞれの群の各日数にてh-caldesmon、 α -smooth muscle actin (α SMA)、Liver X receptor alpha (LXR- α)、Reninについて定量的に評価した。さらに腎臓由来MSCのオープンクロマチン領域の解析として Assay for Transposase-Accessible Chromatin シーケンシング解析 (ATAC-seq)(18)でシグナルが増加、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、特に転写制御領域とその標的遺伝子の距離が近い領域の遺伝子を抽出した。さらにRNAシーケンシング解析 (RNA-seq)(19)で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、2群間の発現変動を比較した。その結果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。

【結果】

LP群の産仔ラットは、出生後より一貫して低体重で推移し、血圧は44週齢

(成人期)以降に有意な上昇を認めた。またタウリン負荷はそれらの変化を予防した。腎臓修復細胞である LRC 数は C 群と LP 群の産仔ラットで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 LP 群の産仔ラットで有意に低下していた。また、LP 群の産仔ラットの EPC コロニー形成能は C 群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 LPT 群の産仔ラットで改善した。LP 群の産仔ラットの腎臓由来間 MSC では、C 群の産仔ラットの腎臓由来 MSC と比較して *h-caldesmon*、 α 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- α の発現も高く、これによりレニンの発現も高かった。腎臓 MSC オープンクロマチン領域の解析では、C 群の産仔ラットの MSC と比較して LP 群の産仔ラットの MSC で、*Protease activated receptor 2*、*Chac1*、*Tspan6* の 3 つの遺伝子の発現亢進が見いだされた。

【考察】

出生児が母胎の低蛋白の影響を受け低体重になり、成獣期の高血圧、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(20-22)。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、胎児期のタウリン負荷により成人期の体重が改善したことも報告されている(23)。本研究でも表現型の違いから適切な動物実験モデルを作成できたと考えられる。

ラット腎臓の虚血再灌流障害モデルの実験において、母胎の低栄養によって産仔ラットは尿細管でLRCの低下を認め、母胎のタウリン補填では予防できなかった。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コロニー形成能は著明に低下しており、その低下は母胎にタウリンを補填することで予防された。このように胎児期低栄養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と考えられた。低栄養母胎へのタウリンの補填は腎虚血貫流モデルでのLRC数には影響せず、EPC機能活性を起こした。この様に胎児期のタウリン不足はMSC系のLRCには影響しなかったが、造血幹細胞由来のEPC機能改善に関わっていると考えられた。

今回の研究では胎児期低栄養の産仔ラットのMSCはより間葉系細胞に分化し、レニンプロモーターを活性化する転写因子 LXR- α およびレニンが高く、胎児期低栄養からの産仔ラット群では腎内レニン・アンジオテンシン系 (RA 系) の亢進がみられ、胎児期低栄養から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。

腎臓由来 MSC のオープンクロマチン領域の解析では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 3 遺伝子についても、これらの遺伝子のいずれかのエピジェネティクスを記憶して腎臓のメサンジウムを含めた間葉系組織を形成する際、上記のメカニズムに寄与している可能性が示唆された。

【結論】

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。

【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. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Rezza A, Sennett R, Rendl M. Adult stem cell niches: cellular and molecular components. *Curr Top Dev Biol*. 2014;107:333-72.
7. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008;132(4):598-611.
8. Maeshima A. Label-retaining cells in the kidney: origin of regenerating cells after renal ischemia. *Clin Exp Nephrol*. 2007;11(4):269-74.
9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. Yang C, Tibbitt MW, Basta L, Anseth KS. Mechanical memory and dosing influence stem cell fate. *Nat Mater*. 2014;13(6):645-52.

14. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(5 Suppl):1344S-52S.

15. 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.

16. 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.

17. 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.

18. 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.

19. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2009;10(1):57-63.

20. 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.

21. 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.

22. 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.

23. 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.