

第 39 回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング

シンポジウム

Nephrogenesis に影響する因子

Factors that influence nephrogenesis

粟津 緑

Midori AWAZU

はじめに

慢性腎臓病(CKD)の発症は胎児期, 周産期, 乳幼児期の環境に影響される (Developmental Origins of Health and Disease : DOHaD 学説)。劣悪環境によりネフロン形成が影響され, ネフロン数が減少し, その後の二次侵襲により高血圧, 腎機能障害を生じると考えられている。

わかっていること

ネフロン数は腎臓1個当たり25万から200万個以上のばらつきがあり, 人種, 性, 出生体重, 在胎週数に影響される(表1)。オーストラリア, アメリカ先住民, 日本人, また女性のネフロン数は少ない。低出生体重児(2,500 g未満)のネフロン数も少ないことが知られているが, 過去の研究では早産(22 ~ 37 週未満)と子宮内発育遅延 (intrauterine growth restriction : IUGR, 該当する妊娠期間の出生児の標準体重と比較して出生体重が10パーセント以下未満)の2つが区別されていなかった。IUGRにおいてネフロン数が減少すると考えられていたが, 近年, 早産児でも少ないことが明らかになっている。ヒトでは胎生9週から34 ~ 36 週までネフロンが形成されるが, 60% のネフロンは第三期(妊娠28 週から40 週まで)にできる。正期産児では生後にはネフロンは形成されないが, 早産児では生後40日までネフロン形成が続く¹⁾。したがって, 胎内環境のみでなく生後の環境もネフロン数に影響する。30 週未満の早産児は胎生34 ~ 36 週以前にネフロン形成が終止してしまうが, そ

表1 ネフロン数に影響を与える因子

人種
性: 女性 12% 少ない
最終身長: 2,800 個/腎/cm
低出生体重: 26 万個/腎/kg 出生体重
出生後合併症(肺疾患, AKI), 抗菌薬
早産
母体: 妊娠糖尿病*
妊娠高血圧症候群*
アルコール*
喫煙*

*: ネフロン数計数ではなく, eGFR, 腎サイズから推定

の原因は胎内環境に比し高い酸素濃度, 腎血流などの血行動態の変化, 呼吸障害による低酸素血症, 感染, 薬剤(動脈管開存に用いられる NSAIDs, 抗菌薬, グルココルチコイド), 低栄養, 急性腎障害(AKI)などの影響と推測される。また, 逆に高出生体重児(4,000 g 以上)は高血圧, 蛋白尿, 腎臓病のリスクが高いことから, ネフロン数が少ないと予想される。母体糖尿病, 妊娠高血圧症候群, 飲酒, 喫煙によっても児の eGFR, 腎サイズは減少することから, ネフロン形成が障害されていると思われる。一般に劣悪環境において生物は増殖より分化を優先することが知られている。ネフロン形成早期終止はネフロン数を犠牲にして早期成熟を目指す防御反応とも考えられる。

ネフロン数減少を呈する種々の胎内劣悪環境モデル(母体低蛋白, 全般的低栄養, グルココルチコイドなど)が存在する(表2)。グルココルチコイドは胎児の肺成熟を促すため母体に投与され, IUGR 児ではコルチゾール不活化酵素 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase type II 減少による内因性ステロイドの曝露がある。したがって, ヒトにおいてもグ

表2 DOHaD 研究の動物モデル

母体：低蛋白 低栄養 グルココルチコイド投与 子宮動脈結紮 母体糖尿病 ビタミン A 欠乏 薬剤投与：ゲンタマイシン、シクロスポリン、 NSAIDs エタノール投与 ニコチン投与
--

ルココルチコイドによりネフロン形成が障害される可能性がある。その他、子宮動脈結紮、母体糖尿病、ビタミン A 欠乏、薬剤(ゲンタマイシン、シクロスポリン、NSAIDs)、エタノール、ニコチン投与モデルなどがある。

種々の動物モデルのなかには母体グルココルチコイド投与など、必ずしも低出生体重を伴わないものもある。したがってヒトにおいても、出生体重が正常でも胎生期、周産期のイベントによりネフロン数が減少している可能性がある。

ネフロン数減少の機序として、母体蛋白制限モデルにおいては胎仔腎内レニンやアンジオテンシンⅡの減少、胎生早期における後腎間葉細胞のアポトーシスの増加が報告されている²⁾。

母体低栄養モデルにおける検討

筆者らは、母体低栄養ラットモデルを用い尿管芽分岐減少がネフロン数減少の一因である可能性を報告した³⁾。尿管芽先端に糸球体が形成されるため尿管芽分岐はネフロン数の大きな決定因子である。母体低栄養では尿管芽分岐数は対照より少ないなりに成長に伴い増加する。しかし、ネフロン形成は通常と同じ時期に終止するため最終ネフロン数は20%減少する。また、尿管芽分岐抑制と一致して尿管芽分岐とネフロン形成に重要なシグナル分子ERK, p38, PI3K, Akt, β catenin が抑制されており、病態に関与すると思われる。

一方、アポトーシスの指標として測定した活性型 caspase-3 (Casp3)発現は予想に反し減少していた。Casp3 はアポトーシスのみでなく遊走、増殖、分化に関与することが近年明らかになっている。後腎を Casp3 阻害薬下で器官培養すると母体低栄養腎と類似し、尿管芽分岐、ネフロン形成が抑制されることが示されている⁴⁾。われわれは Casp3 ノックアウトマウスの糸球体数、胎仔腎尿管芽分岐を検討したところ、*in vitro* の結果と同様に減少していた。

この機序として、培養尿管芽細胞を用いた実験により、Casp3 が Wnt11 の下流において β catenin 抑制、ROCK1 刺激により細胞運動、尿管芽分岐を抑制しているためと考えられた。

一方、DOHaD 学説の機序の一つとしてエピジェネティクスがある。エピジェネティクスとは、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であり、DNA メチル化、ヒストン修飾などがある。われわれはラット胎仔腎の DNA の全般的メチル化が母体低栄養により減少することを見出した。さらに、器官培養系において DNA メチル化を抑制する 5-aza-2'-deoxycytidine を添加したところ、尿管芽分岐と腎成長が抑制され、母体低栄養と同様の結果であった。また、母体低栄養ラット胎仔腎におけるメチル化 DNA の網羅的解析を行ったところ、腎発生に関係する遺伝子でメチル化が変化していたもののほとんどが尿管芽分岐に関与していた。また、母体低栄養ラットにメチル基ドナーである葉酸を補給したところ、胎仔腎のメチル化および尿管芽分岐、糸球体密度の減少が改善した。器官培養においてもメチル基ドナー(葉酸、メチオニン、コリン)欠乏培地では尿管芽分岐と腎成長が抑制され、葉酸添加により改善がみられた。ヒトにおいて母体葉酸欠乏は腎尿路異常を生じることが知られている。また最近、母体葉酸、ビタミン B12 血中濃度が児の腎サイズ、eGFR と相関することが示された⁵⁾。

今後の課題

1)臨床的にも実験においても、簡便で信頼性があり、生体でネフロン数を評価できる技術の開発が望まれる。剖検例、動物実験においてのみ可能なネフロン数評価法のゴールドスタンダードとされる unbiased stereology は労力と時間を要する。腎サイズおよび腎生検標本中の糸球体数からネフロン数を計算する方法、腎生検標本の糸球体密度をネフロン数の代用として用いている報告もある。しかし、腎生検標本は小さいので信頼性に欠ける。近年、カチオン化フェリチンを造影剤として用いた MRI により動物およびヒトの腎臓のネフロン数を計数する方法が開発された。しかし、まだ *ex vitro* 法にとどまる。

2)基礎研究にはマウスをはじめとする動物が用いられるが、これらのモデルとヒトとのネフロン形成の違いは大きい(表3)。ヒトの尿管芽分岐は胎生 20～22 週で終止し、

表3 ヒトと動物のネフロン形成の違い

	ヒト	動物
ネフロン形成終止	胎生 36 週	生後 7 日(マウス) 生後 11 日(ラット)
尿管芽分岐終止	胎生 15 ~ 20 週以前	E19(マウス) E17(ラット)
腎乳頭	4 ~ 18 個	1 個
ネフロンアーケード 形成	20 週以降	ラット, ウサギ

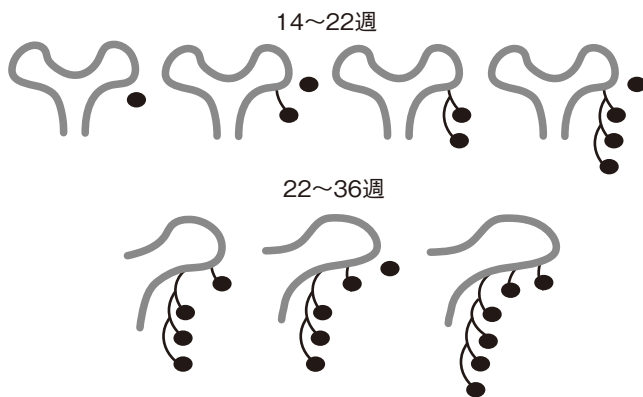


図 ヒトのネフロン形成

ヒトにおいては胎生 14 ~ 22 週には尿管芽分岐はほぼ終止するが、ネフロン形成は続く。尿管芽(集合管)先端に 1 個のネフロンが形成され先端と接合尿管により結合する。次々と新しいネフロンができ、先にできたネフロンとアーケードを形成する。20 ~ 22 週から 32 ~ 36 週にはネフロンは集合管の全長にわたり直接接続する。

その後のネフロンは尿管芽の幹から直接にアーケードを形成しつつできていく(図)。アーケード形成の機構は不明である。モデルとして頻用されるマウスでは胎生期は尿管芽先端に 1 個の糸球体が形成され、生後には複数できるようになることは示されているが、アーケード形成がみられるのかは不明である。

3) 子宮内劣悪環境による影響はネフロン数減少だけではな

い。尿細管、間質、血管、ポドサイト、内皮機能、酸化ストレス反応が変化していることが示唆されている。すなわち、超低出生体重児では尿細管機能異常がみられ(投稿準備中)、尿細管周囲毛細血管密度は減少している⁶⁾。二次侵襲により腎内皮機能低下、酸化ストレス増加を介し虚血、間質線維化が増悪する(投稿中)。

4) 母体グルココルチコイドのように必ずしも低出生体重を伴わない子宮内劣悪環境もあるため、マーカーの開発も必要である。エピジェネティックな影響は臓器により異なる。腎臓への影響を検査する試料として尿が利用できる可能性がある。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

- Rodriguez MM, Gomez AH, Abitbol CL, Chandar JJ, Duara S, Zilleruelo GE. Histomorphometric analysis of postnatal glomerulogenesis in extremely preterm infants. *Pediatr Dev Pathol* 2004 ; 7 : 17-25.
- Welham SJ, Wade A, Woolf AS. Protein restriction in pregnancy is associated with increased apoptosis of mesenchymal cells at the start of rat metanephrogenesis. *Kidney Int* 2002 ; 61 : 1231-1242.
- Awazu M, Hida M. Inhibition of branching morphogenesis and developmentally regulated signaling pathways by maternal nutrient restriction. *Pediatr Res* 2015 ; 77 : 633-639.
- Araki T, Saruta T, Okano H, Miura M. Caspase activity is required for nephrogenesis in the developing mouse metanephros. *Exp Cell Res* 1999 ; 248 : 423-429.
- Miliku K, Mesu A, Franco OH, Hofman A, Steegers EA, Jaddoe VW. Maternal and fetal folate, vitamin B12, and homocysteine concentrations and childhood kidney outcomes. *Am J Kidney Dis* 2017 ; 69 : 521-530.
- Asada N, Tsukahara T, Furuhashi M, Matsuoka D, Noda S, Naganuma K, Hashiguchi A, Awazu M. Polycythemia, capillary rarefaction, and focal glomerulosclerosis in two adolescents born extremely low birth weight and premature. *Pediatr Nephrol* 2017 ; 32 (7) : 1275-1278.