

低出生体重-肥満・非肥満2型糖尿病の病態解明

— 新規モデルマウスによる腎機能解析 —

清水翔一¹⁾, 長野伸彦¹⁾, 片山大地¹⁾, 松田健剛¹⁾,
徳永航¹⁾, 中崎公隆¹⁾, 森岡一朗¹⁾

Analysis of renal function in a low birth weight-type 2 diabetes mouse model

Shoichi SHIMIZU¹⁾, Nobuhiko NAGANO¹⁾, Daichi KATAYAMA¹⁾,
Kengo MATSUDA¹⁾, Wataru TOKUNAGA¹⁾,
Kimitaka NAKAZAKI¹⁾, Ichiro MORIOKA¹⁾

要旨

低出生体重児は将来、慢性腎臓病や糖尿病を発症しやすいが、その発症機序は未だ明確ではない。そのため本研究では低出生体重-肥満・非肥満2型糖尿病モデルマウスを用いてメカニズムを検討した。ICR系統の妊娠マウスを妊娠16.5日に両側子宮動脈の血流をクリップで遮断し、胎児の低酸素と低栄養を引き起こした群を虚血群 (I) として、コントロール群 (C) と比較した。8週齢の時点では2群間に腎病理組織学的な変化を認めなかった。しかしI群では微量アルブミン尿といった、慢性腎臓病・糖尿病性腎症の早期発見のマーカーをすでに認めていた。さらに腎臓のメタボローム解析でも2群間に明確な差を認めた。特に腎障害と関連の深い、コハク酸、S-アデノシルメチオニン、N1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamideに2群間に有意な差異を認めていた。低出生体重-肥満・非肥満2型糖尿病モデルマウスは慢性腎臓病や糖尿病を引き起こす可能性があり、その病態にはコハク酸、S-アデノシルメチオニン、N1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamideが関わっている可能性が示唆された。

1. はじめに

本邦では少子化が進む一方、低出生体重児の割合は減少していない。低出生体重児は将来、慢性腎臓病や糖尿病を発症しやすいが¹⁾、そのメカニズムの解明と予防法の開発が喫緊の課題である。我々は、子宮内虚血操作により低出生体重-非肥満2型糖尿病マウスモデルの作成に世界で初めて成功した (特願2020-116354)²⁾。本研究の目的は、我々の開発したマウスモデルの腎組織形態、尿検査を用いた腎機能評価で慢性腎臓病の存在を明らかにすること、さらに腎臓組織のメタボローム解析を用いて、腎障害の発症機序を解明することである。その結果、低出生体重児の成人期の慢性腎臓病や糖尿病性腎症に関与する新しいメカニズムを明らかにする。

既報では、慢性腎臓病の病態メカニズムの仮説と

して、酸化還元反応の破綻を介したミトコンドリア内膜での代謝異常によってミトコンドリア障害や、腎臓のAMP/ATP比の上昇が、AMP活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の細胞内エネルギー不良を起こすことが推測されている³⁾。しかし、低出生体重児に発症する慢性腎臓病においてもそれらの病態メカニズムが関連しているかは不明である。そのため、子宮内虚血による低出生体重-非肥満2型糖尿病マウスモデルを使用し、慢性腎臓病、糖尿病性腎症発症モデルを作成した。そのモデルを用いて、腎臓組織のメタボローム解析、腎病理学的解析にて低出生体重の慢性腎臓病、糖尿病性腎症発症の病態メカニズム解析を行うことを目的とした。

1) 日本大学医学部小児科学系小児科学分野
清水翔一: shimizu.shoichi@nihon-u.ac.jp

2. 対象及び方法

妊娠12日目のICR系統マウス（三共ラボサービス株式会社 東京，日本）を入手した。すべてのマウスに通常食を与え，水を自由に摂取させた。妊娠マウスを，妊娠16.5日にイソフルラン麻酔下で下腹部を切開した。両側子宮動脈の血流をクリップで遮断し，胎児の低酸素と低栄養を引き起こした群を虚血群（I）とした。15分後クリップを外し，胎子を腹腔内に還納，腹部を縫合した。同様の麻酔下で下腹部の切開のみを行った群をコントロール群（C）とした。出生したI群とC群の雌の新生仔を4週齢で離乳し，8週齢まで普通食で飼育した（各群：n=10）。体重測定は出生時と8週齢まで週2回行った。7～8週齢に蓄尿を行い，尿検査にて尿中 β 2マイクログロブリンおよびアルブミンの測定を行った。尿中クレアチニン，尿中 β 2マイクログロブリンおよびアルブミンは，マウスを実験動物用代謝ケージで飼育した状態で採取した24時間尿検体から，従来のクレアチニンデアミナーゼを用いた酵素法で測定した。その後腎臓摘出を行い，腎臓切片を作成し，hematoxylin and eosin 染色および，Periodic acid-Schiff 染色を行い，まず病理組織学的な検討を行った。具体的には糸球体径，メサンギウムの拡大の有無，硬化病変の割合について比較した。

さらに腎機能や糖代謝に関する腎臓メタボローム解析を行った。各群マウスの凍結腎臓組織切片を処理し，キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析

計を用いて行った。

統計解析はJMP ver. 14（SAS Institute Cary NC, USA）を用いて行った。p値<0.05を有意差とした。なお，全てのプロトコールと手順は，日本大学医学部動物実験委員会の承認を受け実施した（承認番号AP21MED002-2）。

3. 結果

論文公表前のデータであるため現時点での詳細な公表は避ける。出生体重，体重推移については先行研究²⁾と同様に，C群と比較してI群で有意に低体重であった（図1）。つまり子宮内虚血によって低出生体重仔が産まれた。その後もI群は低体重で推移し，8週齢でもI群は低体重のまま推移した。続いて，両群の8週齢における腎臓病理組織所見を比較した。各群の腎臓病理標本を用いて，糸球体径，メサンギウムの拡大の有無，硬化病変の割合において，両群間に有意差は認めなかった。

一方，7週齢での蓄尿尿中 β 2マイクログロブリンおよびアルブミンの結果を図2に示した（n=7）。両群の7週齢の尿中 β 2マイクログロブリンおよびアルブミンの平均値は，C群（26 μ g/L，2.7 mg/dL）と比較して，I群（116 μ g/L，6.5 mg/dL）で有意に高かった。つまり，腎臓病理組織学的な影響はまだ認めていない若い週齢ではあるが，微量アルブミン尿といった，慢性腎臓病・糖尿病性腎症の早期発見のマーカーをすでに認めていた。続いて腎臓のメタボ

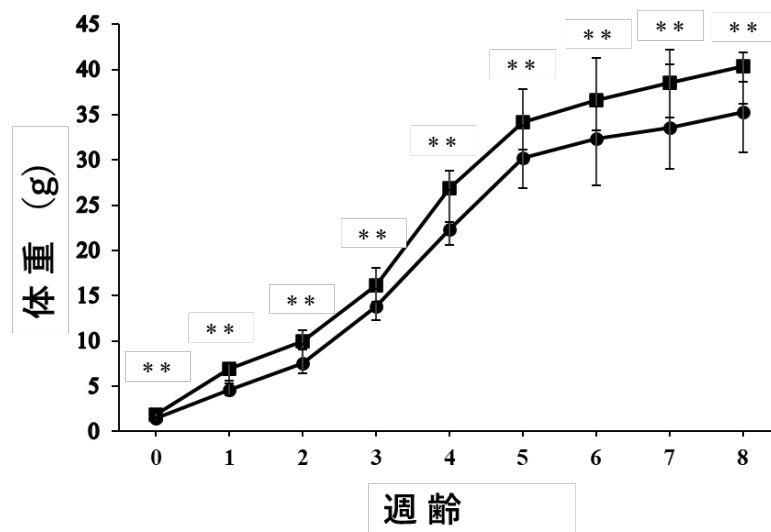


図1 8週齢までの各週齢における2群間の体重の推移（●：I群，■：C群，各群n=10，** p<0.01）

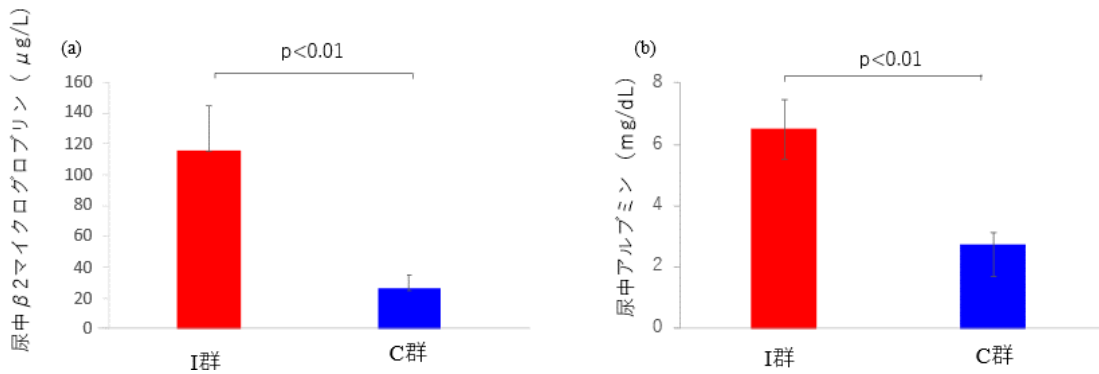


図2 7週齢での蓄尿検査結果 (各群n=7)

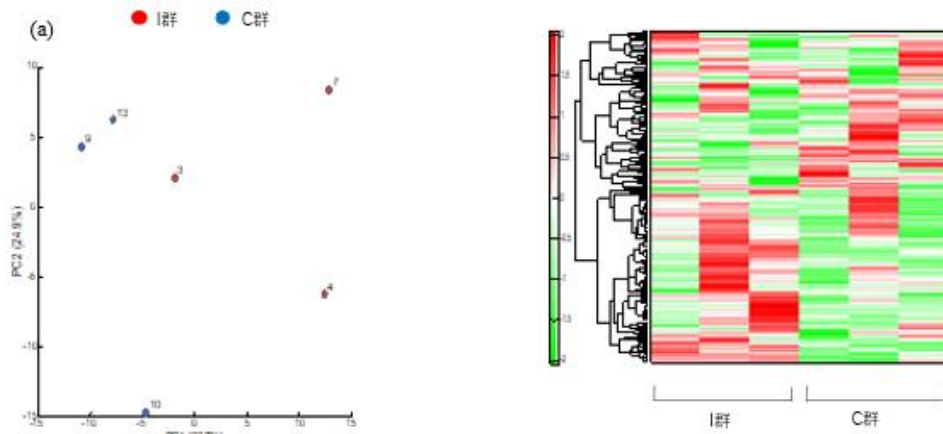


図3 メタボローム解析 (a) 主成分 (PC) 分析 (b) 階層型クラスター分析のヒートマップ表示 (各群n=3)。

ローム解析を行った。主成分分析および階層型クラスター分析のヒートマップ表示において、I群とC群との間に明確な差が見られた (図3)。コハク酸、スベルミジンはC群よりもI群で有意に高く (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.05$)、S-アデノシルメチオニン、5'-シチジル酸は、C群よりもI群において有意に低かった (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.05$)。Human Metabolome Databaseを用いた物性分類では、腎機能障害の指標となる、N1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamideがC群よりもI群で有意に高かった ($p < 0.05$)。

4. 考察

低出生体重-肥満・非肥満2型糖尿病マウスモデルにおいて、8週齢という比較的若い時期では、腎臓病理組織学的な変化は来しておらず、慢性腎臓病、糖尿病性腎症発症を発症するという結論には至

らなかった。しかしすでに微量アルブミン尿を認め、慢性腎臓病、糖尿病性腎症発症の予兆を来していた。腎臓のメタボローム解析においては、C群よりもI群でコハク酸の有意な高値を認めていた。高血糖によりミトコンドリアのコハク酸が多量に産生され、コハク酸受容体が存在する遠位尿細管に伴って存在するプロレニンを活性化し、レニンが産生されるというのでは腎障害に関連するという既報もあり⁴⁾、コハク酸の低出生体重-肥満・非肥満2型糖尿病マウスモデルの慢性腎臓病、糖尿病性腎症発症に関与している可能性が示唆された。またC群よりもI群で有意な低値を示した、S-アデノシルメチオニンはメチオニンから生成され直接のメチル基供与体である⁵⁾。そのためS-アデノシルメチオニンの不足が組織によるメチル化の割合が低下を招き、腎臓組織の組織修復能の低下に繋がった可能性も示唆される。

Human Metabolome Databaseを用いた物性分類では、腎機能障害の指標となる、N1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamideがC群よりもI群で有意に高く、これらが同モデルの慢性腎臓病、糖尿病性腎症発症に関連する可能性があると思われた。今後さらに週齢を重ねて実験をすすめていく予定である。

5. 結 語

低出生体重-肥満・非肥満2型糖尿病モデルマウスは慢性腎臓病や糖尿病を引き起こす可能性を認められた。またその病態にはコハク酸、S-アデノシルメチオニン、N1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamideなどが関わっている可能性が示唆された。

謝辞

本研究は日本大学学術研究助成金〔若手研究者助成〕を受けて行われたものであり、謝意を表します。

文 献

- 1) White SL, Perkovic V, Cass A, et al. Is low birth weight an antecedent of CKD in later life? A systematic review of observational studies. *Am J Kidney Dis* 2009; 54: 248-261
- 2) Katayama D, Nagano N, Shimizu S, et al. A Non-Obese Hyperglycemic Mouse Model that Develops after Birth with Low Birthweight. *Biomedicines* 2022; 10(7):1642
- 3) Kikuchi H, Sasaki E, Nomura N, et al. Failure to sense energy depletion may be a novel therapeutic target in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2019; 95: 123-137
- 4) Toma I, Kang JJ, Sipos A, et al. Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney. *J Clin Invest* 2008; 118: 2526-2534
- 5) Obata F, Kuranaga E, Tomioka K, et al. Necrosis-driven systemic immune response alters SAM metabolism through the FOXO-GNMT axis. *Cell Rep* 2014; 7: 821-833