

低出生体重-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-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はわずかであった。しかしI群では尿細管障害マーカーや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の上昇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-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⁾。また今までも「胎児期低栄養による腎障害および高血圧発症メカニズムの解明」研究をテーマに活動していた。胎児期低栄養ラットの腎臓内の幹細胞がエピジェネティクスの異常を示すことで、児の成体期の腎障害および高血圧発症につながる可能性を証明した³⁾。しかしながら胎児期低栄養モデルは、極端な低蛋白食により、妊娠中の母

体の代謝状態や体環境に変化を起こしうる可能性があり、必ずしもヒトにおける低出生体重児に応用できるのか疑問が残った。そこで低出生体重-非肥満2型糖尿病マウスモデルに応用しようと考えた。低出生体重児は、腎臓由来間葉系幹細胞のエピジェネティクスの異常により、慢性腎臓病や糖尿病性腎症が発症する。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

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

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⁴⁾。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。そのために、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。

2. 対象及び方法

1) 低出生体重-非肥満2型糖尿病マウスモデルの作製

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。産仔が得られた後も離乳するまでメスマウスにはそのままの飼料、飲水を与えた。妊娠したメスマウスについて、妊娠16.5日にイソフルラン吸入麻酔下（導入5%、維持2%）に下腹部を切開した。両側子宮動脈を露出し、胎仔マウスを傷つけないようにクリップで子宮動脈の血流を遮断し（図1）、胎児の低酸素と低栄養を引き起こした群の出生仔を虚血群（I群）とした。12分後にクリップを外し、胎仔を腹腔内に還納、



図1 マウスの子宮動脈の血流遮断

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の出生仔をコントロール群（C群）とした。

2) 腎組織障害の表現型の確認

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）。体重測定は出生時および8週齢まで毎週行った。7～8週齢に、尿中 β 2マイクログルブリンおよびアルブミンの測定を行った。測定に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8週齢に腎臓摘出を行い、腎臓切片を作成し、hematoxylin and eosin 染色および、Periodic acid-Schiff 染色を行い、腎臓病理（糸球体数、糸球体長径、硬化糸球体割合）の検討を行った。さらに腎機能や糖代謝に関しての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。

なお統計解析はJMP ver. 14を用いた。Wilcoxon/Kruskal-Wallisの検定およびWelchのt検定を用いて、 p 値<0.05を有意差とした。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。

(1) 出生体重、体重推移

出生体重の平均値はI群1.5g、C群1.8gと子宮内虚血によって低出生体重仔が産まれた（ $p<0.01$ ）（図2a）。その後もI群はC群と比較し有意に低体重で推移した（ $p<0.01$ ）（図2b）。

(2) 7週齢での蓄尿尿中 β 2マイクログルブリンおよびアルブミン

両群の7週齢の尿中 β 2マイクログルブリン（図3a）およびアルブミン（図3b）の平均値は、C群と比較して、I群で有意に高かった（いずれも $p<0.01$ ）。

(3) 8週齢での腎臓病理検査

両群の8週齢における腎臓病理所見を比較した。糸球体数、硬化割合において両群間に有意差は認めなかった。長径においてはI群でC群より有意に長かった（ $p<0.05$ ）（図4）。

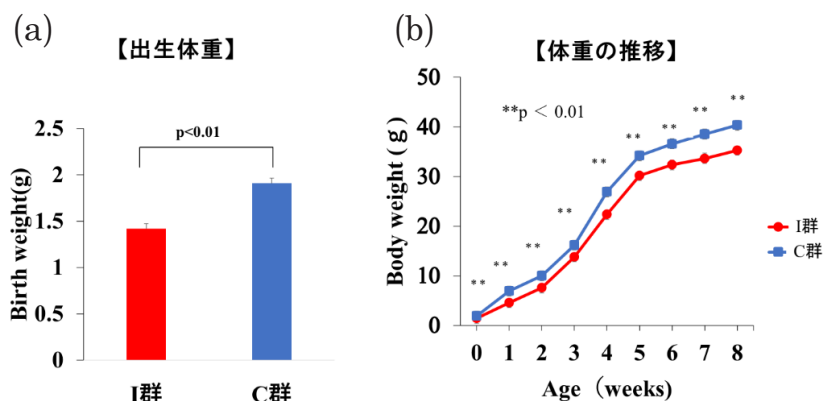
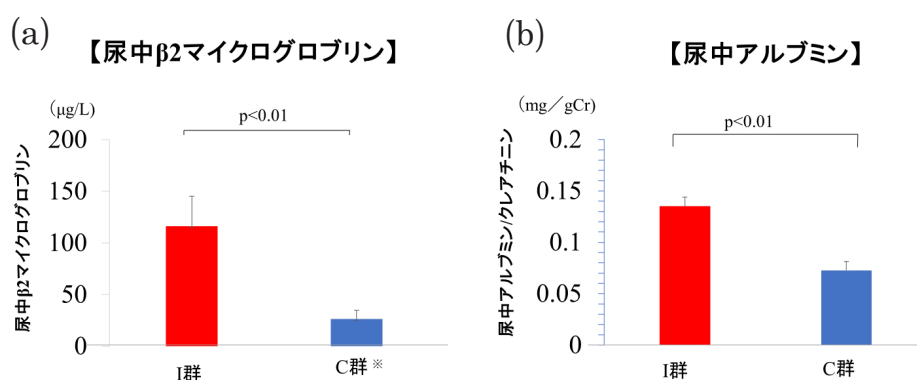


図2 (a) 出生体重 (b) 出生から8週齢までの体重推移 (平均 ± 標準誤差 (各群 n=10))



※C群で感度の10 μg/L以下が複数あり。10 μg/Lとして計上

図3 (a) 尿中β2ミクログロブリン (b) 尿中アルブミンの7週齢での蓄尿検査結果 (平均 ± 標準誤差 (各群 n=6))

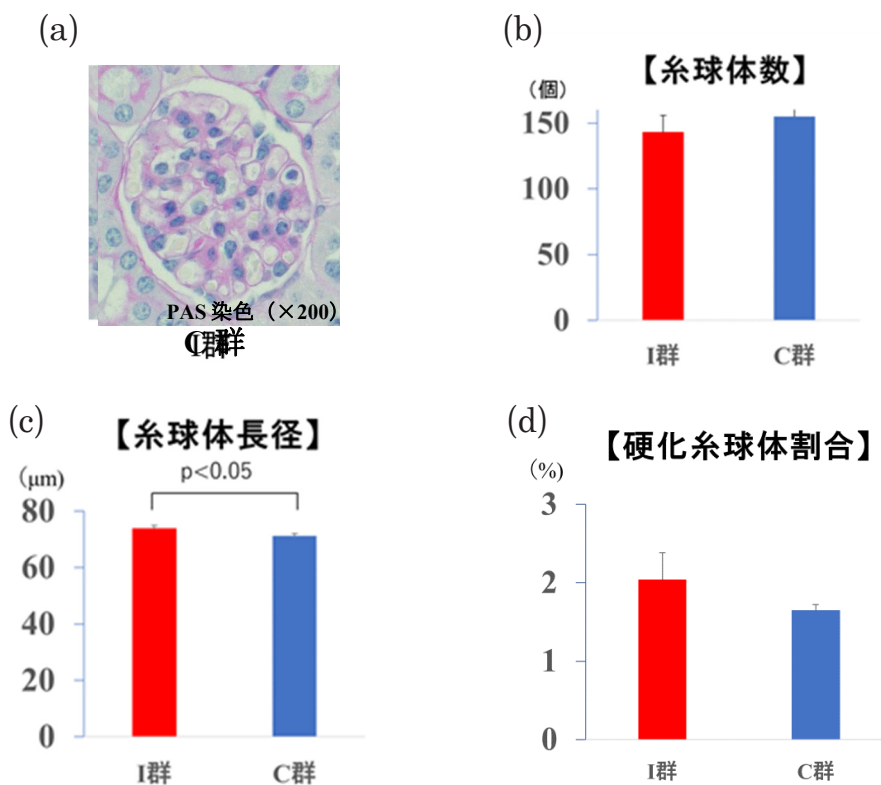


図4 8週齢での (a) 病理像 (b) 糸球体数 (c) 糸球体長径 (d) 糸球体硬化割合の結果 (平均 ± 標準誤差 (各群 n=6))

(4) メタボローム解析

腎臓のメタボ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5)。

また、以下の化合物において、2群間に有意な差を認めた(表1)。赤字で示した、N1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamide, S-Adenosylmethionine, Succinic acidはなかでも腎臓病との関連が知られている。

さらに、Human Metabolome Databaseに基づく検討をおこなったところ、Renal disease, Uremic toxinに分類されるものとして、表2の化合物が挙げられた。うちN1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamideにおいて、2群間に有意な差を認めていた。

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、腎病理組織学的な変化はわずかであり、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。しかしすでに尿細管マーカーや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で伴に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では腎障害に関連するという既報もあり⁵⁾、コハク酸の低出生体重・肥満・非肥満2

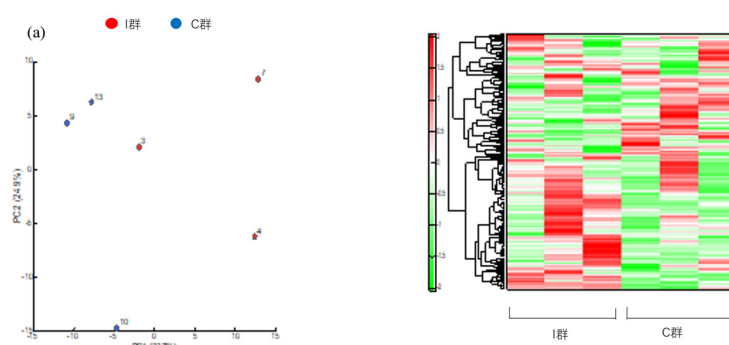


図5 メタボローム解析 (a) 主成分(PC)分析 (b) 階層型クラスター分析のヒートマップ表示(各群n=3)。

表1 メタボローム解析において2群間に有意差を認めた化合物

Compound name	Comparative Analysis		
	Ischemia vs Control		
	Ratio [†]	<i>p</i> -value [‡]	
Argininosuccinic acid	1.5	0.021	*
Ascorbic acid	0.5	0.004	**
CMP	0.7	0.032	*
FAD_divalent	0.8	0.046	*
Hypotaurine	1.3	0.024	*
Inosine	0.8	0.034	*
Isovalerylcarnitine	2.4	0.012	*
myo-Inositol 1-phosphate myo-Inositol 3-phosphate	1.4	0.039	*
N1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamide	2.6	0.049	*
N ⁵ -Ethylglutamine	2.1	0.011	*
Ribulose 5-phosphate	0.7	0.008	**
S-Adenosylmethionine	0.5	0.002	**
S-Carboxymethylcysteine	1.6	0.029	*
Spermidine	1.5	0.024	*
Stachydrine	2.0	0.043	*
Succinic acid	1.8	0.005	**
Taurocholic acid	0.6	0.027	*

表 2. Human Metabolome Database に基づく検討

Major Category	Minor Category	Compound name	Comparative Analysis		
			Ischemia vs Control		
			Ratio [†]	p-value [‡]	
Renal disease, Uremic toxin	Renal failure, Kidney disease, Uremic toxin	3-Indoxylsulfuric acid	2.3	0.231	
	Renal failure	ADMA	1.2	0.391	
	Renal failure, Kidney stone	Citric acid	1.4	0.476	
	Kidney disease, Renal function	Creatinine	1.7	0.127	
	Renal failure, Aciduria, Kidney stone	Glyceric acid	2.3	0.085	
	Kidney disease, Uremic toxin	Guanidinosuccinic acid	1.4	0.255	
	Chronic renal failure	His	1.0	0.913	
	Kidney disease	Lys	1.2	0.344	
	Renal failure	N-Acetylneuraminic acid	1.0	0.760	
	Renal failure	N ¹ -Methyl-4-pyridone-5-carboxamide	2.6	0.049	*
	Renal disease	SDMA	1.3	0.295	
	Kidney failure	Taurine	0.9	0.504	
	Chronic renal failure, Hemodialysis	Taurocyamine	1.1	0.579	
	Kidney failure	Trimethylamine N-oxide	2.5	0.142	

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⁶⁾。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考えられた。

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) Shimizu S, Fukuda N, Chen L, et al. Abnormal epigenetic memory of mesenchymal stem and progenitor cells caused by fetal malnutrition induces hypertension and renal injury in adulthood. *Hypertens Res.* 2024;47 (9) :2405-2415
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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