課題番号	22 若 6

若手研究者助成金　実績報告書

令和　6 年　4 月 30 日

氏　　名：　清水　翔一

所属・資格：　医学部・助教

実施研究所：　医学部・総合医学研究所

1　研究課題

和文表記（40 字以内）

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

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

2　研究期間

令和 4 年度

※令和 4 年度　～　令和 5 年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

3　研究目的

本邦では少子化が進む一方、低出生体重児の割合は増加している。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。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）。本研究の目的は、我々の開発したマウスモデルの①腎組織形態、尿・血液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、②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。本研究の成果は、低出生体重児の慢性腎臓病や糖尿病性腎症の早期発見のバイオマーカーの発見に繋がり、その予防法の開発に寄与できる。

課題番号	22 若 6

4　研究概要

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に陥っていること（Kidney Int, 2017）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（Kidney Int, 2019）。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。本研究課題の核心は、「低出生体重-肥満・非肥満 2 型糖尿病動物モデルは慢性腎臓病や糖尿病性腎症を来すのか、その病態は何か？」である。そこで、成獣期の腎臓を用いたメタボローム解析や腎病理学的解析を行うことで病態解明ができると確信している。将来、バイオマーカーを明らかにし、早期に腎障害を発見して治療介入を行うことで、腎障害の進行およびそれに伴う透析導入の減少に寄与できることが大きく期待される。

本研究の目的は、低出生体重-肥満・非肥満2型糖尿病モデルが慢性腎臓病、糖尿病性腎症を発症するかを明らかにし、メタボローム解析と腎病理学的解析でその病態を明らかにすることである。そのために、特許申請を行った通り独自性が極めて高い、我々のオリジナルのモデルである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（特願2020-116354）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。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-慢性腎臓病の病態メカニズム解析を行った。

以下に具体的な方法を示す。ICR系統の妊娠マウスを妊娠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、胎仔を腹腔内に還納、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週齢まで毎週行った。7～8週齢に蓄尿を行い、尿検査にて尿中アルブミンおよび尿細管マーカーの測定を行った。8週齢に腎臓病理の検討および腎臓組織を用いたメタボローム解析を行った。

本若手研究者助成の目的は、すでに採択された科研費に関連した事項について、さらに発展させることにある。採択された科研費の研究課題（課題番号 : 22K15908）は、低出生体重児の胎生期の環境が成体の慢性腎臓病や高血圧発症に関与する新しいメカニズムを明らかにする研究である。その病態解明の主眼は組織幹細胞や前駆細胞のエピジェネティクス異常といった胎生期の素因にある。一方、本研究は出生後の変化に主眼を実験を行った。

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）。

課題番号	22 若 6

5　研究結果

（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 1a)。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 1b)。

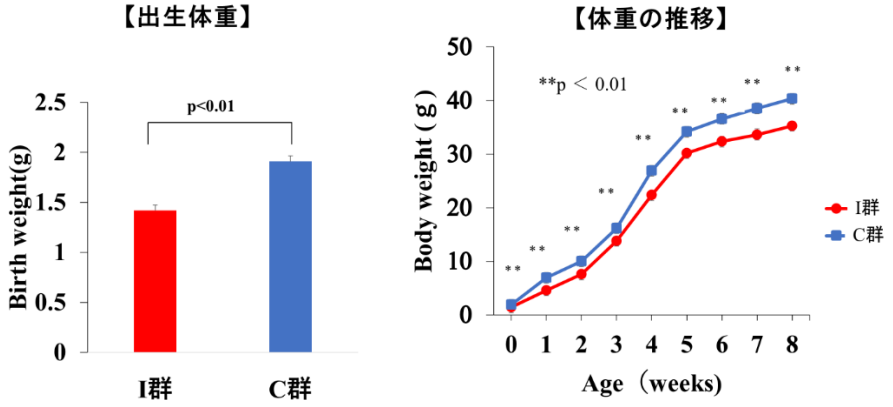


図 1　（a）出生体重(b)出生から 8 週齢までの体重推移（平均±標準誤差(各群 n=10)）

(2)7 週齢での蓄尿尿中 β2 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 β2 マイクログルブリンおよびアルブミンの平均値は、C 群と比較して、I 群で有意に高かった(いずれも p<0.01)(図 2)

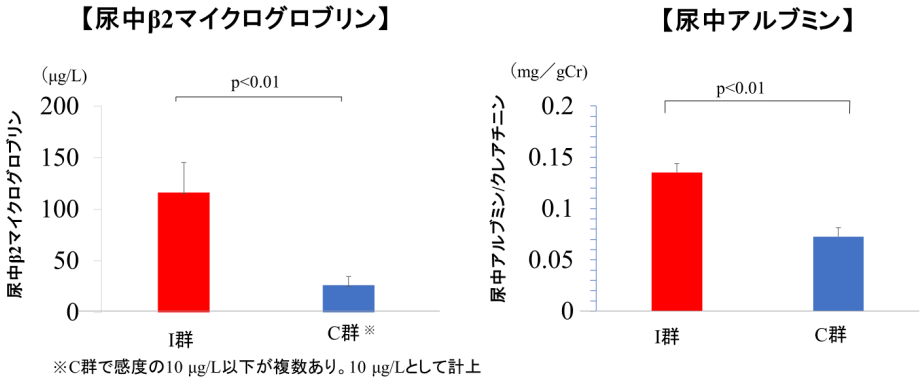


図 2　7 週齢での蓄尿検査結果(平均±標準誤差(各群 n=6))

（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)。

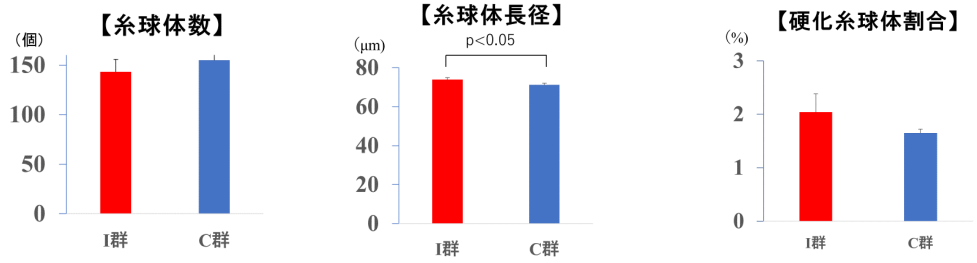


図 3　8 週齢での腎病理結果(平均±標準誤差(各群 n=6))

課題番号	22 若 6

〔5　研究結果（つづき）〕

(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 4）。

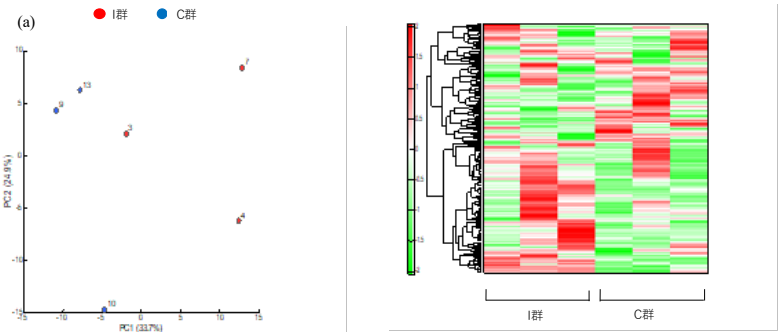


図 4. メタボローム解析(a) 主成分(PC)分析(b)階層型クラスター分析のヒートマップ表示(各群 n=3)。

また、以下の化合物において、2 群間に有意な差を認めた。うち、N1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamide、*S*-Adenosylmethionine、Succinic acid は腎臓病との関連が知られている。

Compound name	Comparative Analysis Ischemia vs Control		
	Ratio ¶	*p*-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 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

これらの結果から、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、腎臓病理組織的差異は乏しかった。一方ですでに尿細管マーカーの上昇や微量アルブミン尿も認めており、形態学的変化には至らないものの腎障害の傾向を認めた。メタボローム解析では腎障害に関連する N1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamide らの関与が示唆された。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る。

課題番号	22若6

6　将来獲得を目指す学内外の競争的資金の種類　（※研究計画書に記載したものを記入すること）

日本小児内分泌学会未来開拓研究助成、公益財団法人母子健康協会小児医学研究助成、一般財団法人近藤記念医学財団学術奨励賞、公益財団法人小児医学研究振興財団アサヒグループ食品（和光堂）研究助成金

7　本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況

氏　　名	申請年度	研 究 種 目	研　究　課　題	採・否
清水翔一	令和5年度	公益財団法人川野小児医学奨学財団研究助成金	低出生体重仔の成獣期の糖尿病性腎症発症機序の解明とタウリンによる予防効果	採

8　学会発表等

要旨集の抜き刷り，発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会，発表会名等	発表テーマ	発表年月
Shimizu.S, Morioka.I, et al.	第58回高血圧関連疾患モデル学会	Epigenetic memory of stem and progenitor cells by the fetal malnutrition induce renal injury and hypertension with activation of renal renin-angiotensin system.	2022年10月
清水翔一、長野伸彦、森岡一朗他	第6回臨床DOHaDセミナー	早産児の在胎週数と臍帯血アミノ酸分画の関係	2023年1月
Nakazaki.K,Nagano.N, Shimizu.S, Morioka.I, et al.	Pediatric Academic Societies Meeting 2023	Body fat reducing effects of a whey protein diet	2023年4月
清水翔一、長野伸彦、森岡一朗他	第7回臨床DOHaDセミナー	早産児の在胎週数と臍帯血アミノ酸分画の関係第2報	2024年1月
清水翔一、長野伸彦、森岡一朗 他	第127回日本小児科学会学術集会	低出生体重児の腎の病態解析：低出生体重モデルマウスの成獣期における検討	2024年4月

9　著書・雑誌論文

著書，雑誌，抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
Nakazaki.K, Nagano.N, Shimizu.S, Morioka.I, et al.	Nutrients / Body Fat Reducing Effects of Whey Protein Diet in Male Mice	15巻10号	2023年5月	Multidisciplinary Digital Publishing Institute・Basel, Switzerland

１０　本研究課題に関するその他の発表（新聞，一般雑誌掲載等）

課題番号	22若6

１１　他の研究への発展

「低出生体重-高血糖発症マウスモデルにおける成長ホルモン治療の効果に関する研究」を開始し、同マウスモデルにおいて、成長ホルモンを投与することで、糖尿病や慢性腎臓病発症を抑制しうるか検討を開始している。

１２　その他の成果

第58回高血圧関連疾患モデル学会 荻原賞を受賞（清水）

１３　本研究課題による発明届の提出及び知的財産権の出願・取得状況

名　　称	知的財産の種類	発　明　者 （考案者・創作者）	権　利　者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日

※ホームページ等での公開（☑可・□否）いずれかをチェックしてください。
否の場合は，理由書を別途添付のこと。