

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

山本 信

専攻分野：内科学

コース：腎臓・高血圧内科

指導教授：柴垣 有吾

主論文の題目：

Prorenin Receptor and ERK are Associated with Kidney Development in the Fetal Rat Administered Prenatal Glucocorticoid
(プロレニン受容体と ERK は出生前グルココルチコイド投与における胎児ラット腎の発達に關与する)

共著者：

Yuko Takeba, Tsukasa Kobayashi, Atsuko Kamijo-Ikemori, Koichiro Ichimura, Masanori Ootaki, Yuki Ohta, Taroh Iiri, Yugo Shibagaki, Naoki Matsumoto

緒言

胎児期、乳児期の環境要因が成長後の疾患発症リスクに關係するとう Development Origins of Health and Diseases (DOHaD) 仮説に基づき、早産児が慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease)のリスク因子であることが知られている。妊娠母体への出生前グルココルチコイド (glucocorticoid:GC)は胎児の肺の成熟を促すが、種々の臓器でも成熟を促進することが知られている。出生前 GC 投与の腎臓への影響は、ラットで胎児の成長後に糸球体数が少なく高血圧を発症するという報告がある一方、ヒヒで早産児の成熟糸球体の数が増加したという報告があり、良否について統一した見解はない。腎の発達においてプロレニン受容体(prorenin receptor:PRR)はレニン-アンギオテンシン-アルドステロン系と独立して細胞の増殖・分化に關与し、細胞増殖因子である

extracellular signal-regulated kinase (ERK) を惹起して成熟に関与することが知られている。しかし早産児の腎臓における PRR や ERK の発現および出生前 GC 投与による因子の変化については不明である。本研究は出生前 GC 投与の PRR、ERK、腎の成熟に与える影響について早産児モデルラットを用い検討を行った。

方法・対象

妊娠 17 日、19 日のラットにそれぞれ 2 日間ごま油に溶解したデキサメサゾン (dexamethasone:DEX) (1.0mg/kg, 2.0mg/kg) 投与を行い、妊娠 19 日、21 日に帝王切開後胎仔腎を採取した(以下 19F-1.0, 19F-2.0, 21F-1.0, 21F-2.0)。対照群はごま油のみを投与した(以下 19F-c, 21F-c)。腎臓組織はホルマリン固定し免疫組織染色を行い、PRR、ERK、p-ERK 発現の局在を観察した。画像解析は winROOF (Mitani, Tokyo, Japan) により蛋白発現部位の面積を測定した。また胎児腎臓由来細胞の Human embryonic kidney (HEK293) 細胞に異なる濃度のデキサメサゾン (0.03-100 μ M) を添加して 24 時間培養を行い、mRNA、蛋白発現量、細胞増殖の評価を PCR、ウエスタンブロット、MTT assay により行った。

動物実験は聖マリアンナ医科大学実験動物委員会(承認 1802011 号)の承認を得て行った。統計は JMP software version 13.2.1 (Tokyo, Japan) を使用し Dunnet 検定を用いて行った。

結果

免疫組織染色においては 19F-c では nephrogenic zone とよばれる腎皮膜直下の未成熟糸球体の集合した組織の間質に ERK の発現が多く認められた。19F-1.0, 19F-2.0 では 19F-c と比較し髄質側(内側)の間葉細胞または糸球体のメサンギウム領域が染色され、21F-c および 21F-1.0, 21F-2.0 と同様の特徴であった。p-ERK は 19F-c では髄質全体に陽性を呈する一方 19F-1.0 や 19F-2.0 では尿細管内腔に限局して染色

される傾向があり、21F-c, 1.0, 2.0 の特徴であった。PRR は 19F-c では nephrogenic zone の間葉細胞や尿管芽など広範な部位において陽性を示した。19F-1.0, 2.0 では尿管芽、集合管に限局し PRR の発現を認めた。未熟な間葉細胞の染色は減少していた。DEX 投与は PRR の発現に影響を与えなかった。

DEX を添加した HEK293 細胞の増殖反応は、高濃度群 (30 μ M、100 μ M) は DEX 非添加群と比較し有意な細胞増殖能の低下が認められた。DEX 投与群で ERK1/2 の蛋白発現量増加 ($p < 0.05$) が認められた。PRR は mRNA, 蛋白発現ともに変化がなかった。

考察

今回我々は腎発達に關与する PRR、ERK に注目して検討を行った。In vitro、in vivo の両面から DEX 投与は ERK の発現を増加させることを確認し ERK は mitogen activated protein kinase (MAPK) 経路のシグナルとして尿管芽の発生に關わること、腎の発達過程で細胞増殖の分布と一致して発現することが知られており、この結果からは DEX 投与が ERK を介して腎の成熟を促進させる可能性が示唆された。PRR は ERK の活性化の他、Ret/Wnt11 経路を介して尿管芽の分枝や集合管の分化・成熟に關わることを知られている。実験では DEX 投与に伴い PRR の局在や発現量の変化は観察されなかったものの、DEX 投与では形態学的に成熟した尿細管に限局して発現することが確認された。これより DEX 投与が PRR を介して尿細管の成熟に關与している可能性が考えられた。

In vitro の実験では ERK の発現が増加する一方で細胞の増殖は抑制されており、ERK と細胞増殖の關係は認められなかった。しかし胎児腎の発達過程では尿細管などの形態変化の過程でアポトーシスの機構が働くことが知られており、細胞増殖抑制が細胞の分化・成熟に伴うアポトーシスを反映している可能性も考えられた。

今回 GC の腎の発達に与える影響を検討したが、出生前 GC 投与による

腎の発達は PRR と ERK の発現増加のみで説明がつくものではなく、成熟の評価には今後、組織の形態学的分析や他のシグナル経路の評価を含めて検討が必要である。

結論

腎の発達には PRR および ERK の発現が必要であるが、出生前 GC 投与は PRR を介して ERK の発現を増加させ、胎児腎臓の成熟を促す可能性が考えられた。