

胚環境操作-糖尿病性腎症モデル MEM マウスへの塩分過剰摂取による ヒト類似高血圧性腎症モデルの作出

石山 詩織

山梨大学大学院総合研究部

概要

【目的】慢性腎臓病 (chronic kidney disease; CKD) の有効な治療法や予防法は未開発であり、その原因の一つに、ヒトの病態を再現できる動物モデルが存在しないことがある。このような背景の中、近年母親の痩せによる胎生期低栄養や胚の体外培養環境が、将来の 2 型糖尿病や慢性腎症などの生活習慣病の発症リスクが決定することを指し示す知見が集約されてきた [Developmental Origins of Health and Disease 学説]。

近年我々は、ヒトのように着床前胚を特定の培地での体外培養と、その後成体での食餌操作の環境操作を組み合わせることによって、糖尿病性腎症を発症するモデルマウスを作成することに成功した。本研究では、胚環境操作 MEM マウスを用いて、塩分過剰摂取で自然発症する CKD モデルを作成し、その病態が観察されるモデルの構築を目指すことを目的とした。

【方法】胚発生期に α MEM 培地で体外培養を行い、子宮に戻し出産させた MEM マウス (対照は KSOM 培地) を離乳まで母獣とともに飼育し、離乳直後 10% 砂糖水を投与し、1.5 ヶ月投与後に試験飲料として自由摂取によって 1 ヶ月次の通り投与した: 1) 塩分水非投与の対照 KSOM マウスおよび 2) MEM マウス, 3) 1.0% NaCl 水を投与する MEM マウス (軽度塩分群) および, 4) 3.0% NaCl 水を投与する MEM マウス (重度塩分群)。

【結果】肝臓切片の AZAN 染色より、対照 MEM 群では見られなかった肝線維化の進行が、軽度塩分群および重度塩分群では、血管周囲において観察された。肝臓における炎症関連遺伝子発現量は、*Tnfa* では軽度塩分群と比較して、*Ly6c* では対照 MEM 群と比較して、重度塩分群で有意に増大した。回腸切片の HE 染色より、対照 MEM 群では観察されなかった回腸絨毛構造の破綻や絨毛の長さの縮小が、軽度塩分群および重度塩分群で観察された。回腸における腸バリア機能関連遺伝子発現量では *Muc4* は、対照 MEM 群と比較して軽度塩分群および重度塩分群で有意に減少した。

【考察】本研究によって、出生前後の劣悪な栄養環境に加え、過剰塩分といったさらなる炎症反応増大刺激が加わると、回腸の絨毛構造の破綻に加え、肝臓における脂肪肝炎疾患の増悪が誘導され、重篤化する可能性があることが示唆された。本モデルは、ヒトの現象に類似し、慢性炎症悪化により臓器障害を引き起こすモデル動物である可能性が示唆された。

1. 研究目的

慢性腎臓病 (chronic kidney disease; CKD) は予後が悪く、有効な治療法や予防法は未開発である。この分野が未開発である原因の一つに、ヒトの病態を再現できる動物モデルが存在しないことがある。特にヒトでの腎症は

食生活などの外部環境により自然発症する一方、動物モデルでは薬剤投与や片腎摘出、遺伝子欠損などヒトとかけ離れた極度な処置を経ないと発症しない。そのため、人における外部環境を正しく再現できていないため、人に類似した腎症動物モデルが作成されていないと考えら

れる。近年、母親が過度なダイエットなどによる低栄養による低出生体重児や体外受精および胚の体外培養環境が、将来の2型糖尿病や慢性腎症などの生活習慣病の発症リスクが決定することを指し示す知見が集約されてきた〔Developmental Origins of Health and Disease 学説〕¹⁾。このような背景の中、我々は、ヒトのように着床前胚の発生時に特定の培養液で体外培養と、その後成体で食餌操作(高脂肪・高少糖食摂取)といった二つの環境操作を組み合わせることによって、糖尿病性腎症を発症するモデルマウスを作成することに成功した。具体的には、胚発生初期に体外で、 α MEM 培地(低タンパク質培地暴露)で培養することにより、通常培地(CZB や KSOM 培地)で飼育したマウスに比べ顕著な高血糖(2型糖尿病)や腎症を自然発症するマウス(MEM マウス)を作出することに成功した^{2,3)}。上記 MEM マウスでは、特に、糖代謝異常で誘導される糸球体硬化と、高血圧で誘導される小動脈内膜肥厚も観察される特徴がある³⁻⁵⁾。特に、これまでの動物実験では、生理的濃度ではない塩分(高血圧モデル:食餌の重量比 10%以上)をマウスに負荷し高血圧を誘導してきたが、本マウスでは、通常塩分量の摂取(マウスの食餌中の標準塩分量は、0.26 重量%)であっても、腎糸球体硬化や細動脈内膜肥厚が観察されるところが特記に値するところである。ヒトにおいて、上記のような軽度の腎障害の上に、塩分の過剰摂取は、腎症と高血圧症をさらに悪化させると考えられる。しかし、これまで MEM マウスのような、糖尿病により誘導される腎症の初期病変を呈するモデルが開発されておらず、塩分の腎症に与える影響を正しく評価することが難しかった。そこで本研究では、胚環境操作 MEM マウスを用いて、塩分過剰摂取で自然発症する CKD モデルを作成し、CKD の中期以降の病態が観察されるモデルの構築を目指すことを目的とした。

2. 研究方法

2.1 実験動物

胚発生期に α MEM 培地で体外培養を行い、子宮に戻し出産させた MEM マウス(対照は通常 KSOM 培地)を離乳まで母獣とともに飼育し、離乳直後 1 ヶ月通常食(MF 食) + 10%(w/v) 砂糖水を投与した。10%(w/v) 砂糖水を 1.5 ヶ月投与完了 1 週間前に、すべてのマウスの体重 6 時間絶食後の空腹時血糖を測定し、MEM マウス

はそれぞれ体重および空腹時血糖値に差がないように 3 群に分けた:

1) 塩分水(NaCl)を追加で投与しない MEM マウス(対照 MEM 群;n = 8), 2) 1.0%(w/v) NaCl 水を投与する MEM マウス(軽度塩分群;n = 7)および、3) 3.0%(w/v) NaCl 水を投与する MEM マウス(重度塩分群;n = 8)。

よって、塩分水(NaCl)を追加で投与しない KSOM マウス(対照群;n = 13)を加え、計 4 群に群分けし、10%(w/v) 砂糖水に NaCl を添加もしくは無添加した試験飲料を 1 ヶ月投与した。この時、飼料および試験飲料は自由摂取とした。NaCl 水は過剰塩分摂取により炎症が増大する生理学状態を模すために投与を行った。試験飲料投与から 1 ヶ月後に解剖を行った。3.0%(w/v) NaCl 水を投与した重度塩分群において、試験飲料投与開始から解剖までに 1 匹死亡したため、すべての解析は 11~14 週齢の雄性 MEM マウス 23 匹および 12 及び 14 週齢の雄性 KSOM マウス 13 匹で行った。

2.2.1 疾患発症評価・病理評価

i) 糖尿病病態の進展の評価:

6 時間空腹時血糖値および随時血糖値を測定した。

ii) 尿中腎機能マーカー、血圧の測定:

尿中アルブミン、尿中クレアチニンはキットを用いて測定し、血圧は非観血式血圧計により測定した。

iii) 肝臓の病態進展の評価:

肝臓組織切片を AZAN 染色し、脂肪滴蓄積および線維化病態を観察した。

2.2.2 代謝・炎症・酸化ストレス関連遺伝子の発現

肝臓においては、糖・脂質代謝関連遺伝子、炎症関連遺伝子および酸化ストレス関連遺伝子の発現量を、小腸(回腸)においては炎症関連遺伝子、免疫関連遺伝子および腸バリア機能関連遺伝子の発現量を q-PCR で測定した。

2.3 統計解析

実験データは平均値(Mean) ± 標準誤差(Standard Error of the Mean; SEM)で示した。本研究では、異なる培地(α MEM または KSOM)については対応のない Student's *t*-test を、MEM マウス間については、Tukey-Kramer 法を行った。 $P < 0.05$ の場合を統計学的に有意な差と判定した。

Table.1 Variables of KSOM control mice and MEM mice administrated 10% sucrose solution with/without added NaCl for 1 month.

	KSOM		MEM	
	Control	Control	with 1.0% NaCl	with 3.0% NaCl
Body weight before NaCl solution (g)	48.7 ± 1.2	50.7 ± 2.1	49.9 ± 0.8	51.8 ± 1.0
Fasting blood glucose before NaCl solution (mg/dL)	160 ± 13	148 ± 4	155 ± 12	162 ± 12
Body weight at dissection (g)	63.8 ± 1.6	57.1 ± 3.8 ^a	54.3 ± 0.8 ^a	38.0 ± 2.9 ^b
Fasting blood glucose after 3 weeks test solution (mg/dL)	180 ± 7.1	161 ± 13.1 ^a	169 ± 8.5 ^a	105 ± 11.0 ^b
Non-fasting blood glucose at dissection (mg/dL)	220 ± 27	215 ± 20 ^{ab}	257 ± 53 ^a	118 ± 12 ^b
Blood pressure after 3 weeks test solution (mmHg)	117 ± 2.4	124 ± 3.5 ^a	110 ± 4.6 ^{ab}	108 ± 4.0 ^b
Albumin/creatinine ratio at dissection	0.0947 ± 4.18×10 ⁻⁵	0.0943 ± 4.77×10 ⁻⁵	0.0944 ± 5.75×10 ⁻⁵	0.0942 ± 2.85×10 ⁻⁵
Liver weight (g/g BW)	0.06 ± 0.002	0.06 ± 0.001 ^a	0.05 ± 0.003 ^a	0.02 ± 0.001 ^b
Kidney weight (g/g BW)	0.01 ± 0.001	0.01 ± 0.001 ^a	0.02 ± 0.001 ^a	0.01 ± 0.001 ^b
Mesenteric adipose tissue weight (g/g BW)	0.02 ± 0.001	0.02 ± 0.002 [*]	0.02 ± 0.001	0.02 ± 0.004
Epididymis adipose tissue weight (g/g BW)	0.05 ± 0.002	0.04 ± 0.004 ^a	0.05 ± 0.001 ^a	3.09 ± 0.153 ^b
Test solution intake (g/day)	2.7 ± 0.2	7.1 ± 0.9 ^{*,a}	2.4 ± 0.3 ^b	2.5 ± 0.3 ^b
Food consumption (g/day)	1.0 ± 0.1	6.1 ± 1.1 ^{*,a}	1.3 ± 0.2 ^b	0.6 ± 0.1 ^b

Data are expressed as means ± standard error of the mean for 10-17 mice. Statistical analyses were performed by Student's *t*-test between KSOM and MEM control (**P* < 0.05), and by one-way analysis of variance (ANOVA); post hoc comparisons of multiple groups were carried out using the Tukey-Kramer's multiple comparison test among MEM mice. a-b: Different superscripts indicate significant differences (*P* < 0.05). BW, body weight; MEM, minimum essential medium mice; KSOM, potassium simplex optimized medium mice.

3. 研究結果

3.1 塩分水投与による体重, 摂餌量, 臓器重量, 血糖値への影響

解剖時の体重および血糖値においては, 対照MEM群と比較して重度塩分群で減少し, 軽度塩分群と比較して, 重度塩分群で減少していた (Table.1)。解剖時の血圧においては, 対照MEM群と比較して軽度塩分群で減少し, 対照MEM群と比較して, 重度塩分群で減少していた一方, 対照群と比較して対照MEM群で増大傾向が観察された (*P* = 0.09)。また, 19~21週齢時点における摂餌量については, 対照MEM群と比較して重度塩分群で増大傾向であった (*P* = 0.08)。解剖時の肝臓重量においては, 対照MEM群と比較して軽度塩分群で減少し, 対照MEM群と比較して重度塩分群で減少していた。解剖時の副睾丸脂肪重量においては, 対照MEM群と比較して重度塩分群で減少し, 軽度塩分群と比較して, 重度塩分群で減少していた。また解剖時の腸間膜脂肪重量においては, 対照群と比較して対照MEM群で減少したことに加え, 対照MEM群と比較して重度塩分群で減少し, 軽度塩分群と比較して重度塩分群で減少していた。

3.2.1 塩分水投与による肝臓の組織病態へ及ぼす影響

肝臓切片をAZAN染色し, 線維化病態を観察したところ, 塩分投与を行っていない対照群および対照MEM群では線維化の進行が見られない一方, 塩分水を投与した軽度

塩分群および重度塩分群では, 血管周囲の線維化が進展している様子が観察された (Fig.1)。

3.2.2 塩分水投与による肝臓における糖・脂質代謝関連遺伝子発現量への影響

肝臓における解糖系関連遺伝子発現量を測定したところ, 測定した遺伝子発現量の群間における有意差は観察されなかった (未掲載データ)。一方, 塩分水投与後1ヶ月の肝臓における糖新生関連遺伝子発現量を測定したところ, *Gys2* および *Pck1* の遺伝子発現量は, 対照MEM群と比較して, 重度塩分群で有意に増大し, 軽度塩分群と比較して重度塩分群で有意に増大した (Fig.2)。また, 脂肪合成関連遺伝子の発現量を測定したところ, *Fasn* および *Acyl* の遺伝子発現量は, 軽度塩分群と比較して重度塩分群で有意に増大した。

3.2.3 塩分水投与による肝臓における炎症, 線維化および酸化ストレス関連遺伝子発現量への影響

肝臓における炎症関連遺伝子発現量を測定したところ, *Tnfa* の遺伝子発現量は, 軽度塩分群と比較して重度塩分群で有意に増大し, *Ly6c* の遺伝子発現量は, 対照MEM群と比較して重度塩分群で有意に増大した (Fig.3A)。*s100a10* の遺伝子発現量は, 対照MEM群と比較して重度塩分群で有意に減少した。

また, 肝臓における線維化関連遺伝子として *Tgfb1* 発現量を測定したが, 各群間における有意差は観察されなかった (Fig.3B)。

さらに、肝臓における酸化ストレス関連遺伝子発現量を測定したところ、*Nox2* および *p47phox* の遺伝子発現量は、対照 MEM 群および軽度塩分群と比較して重度塩分群で有意に増大した (Fig.3C)。ROS 除去関連遺伝子 *Grs*, *Gss*, *Sod1* および *Sod2* の発現量は、対照 MEM 群と比較

して重度塩分群で有意に増大した (Fig.3D)。また、*Sod1* の遺伝子発現量では、軽度塩分群と比較した場合においても重度塩分群で有意な増大が観察された。

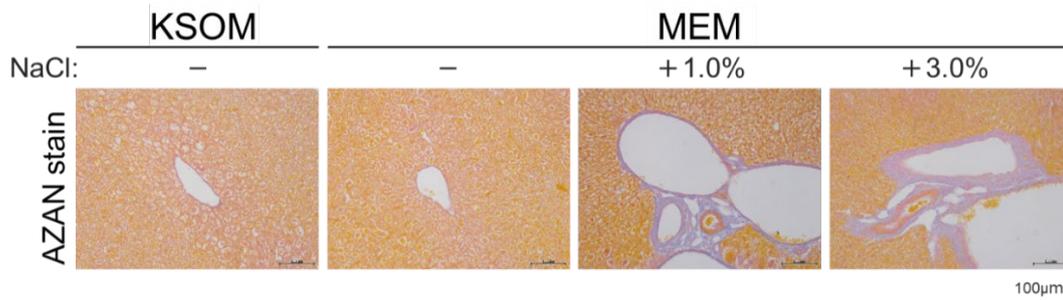


Fig.1 Effects of treating NaCl water after feeding high-fat, high-sucrose diet on the hepatic fibrosis by AZAN stain in control and MEM mice with/without NaCl.

Images show the liver tissue section was stained AZAN for 7-13 mice. MEM, minimum essential medium mice; KSOM, potassium simplex optimized medium mice.

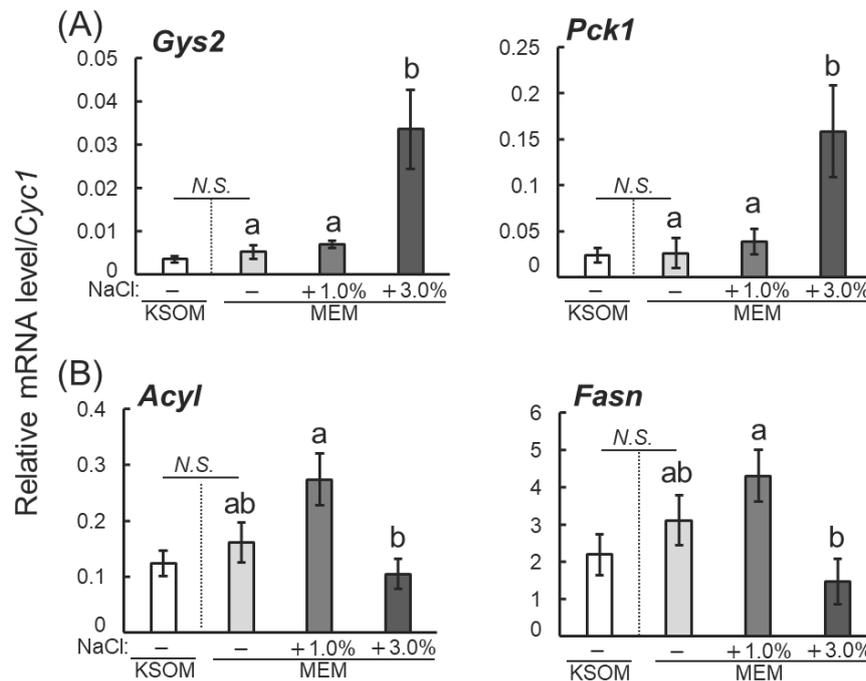


Fig.2 Effects of treating NaCl water after feeding high-fat, high-sucrose diet on the expression of mRNA related to metabolism in the liver of control and MEM mice with/without NaCl.

The results of each sample were normalized to *Cyc1*. Data are expressed as means \pm standard error of the mean for 7-13 mice. (A) shows glucose metabolism and (B) shows lipid metabolism. Statistical analyses were performed by Student's *t*-test between KSOM and MEM control ($*P < 0.05$), and by one-way analysis of variance (ANOVA); post hoc comparisons of multiple groups were carried out using the Tukey-Kramer's multiple comparison test among MEM mice. a-b: Different superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$). KSOM, potassium simplex optimized medium mice; MEM, minimum essential medium mice; N.S., no significant.

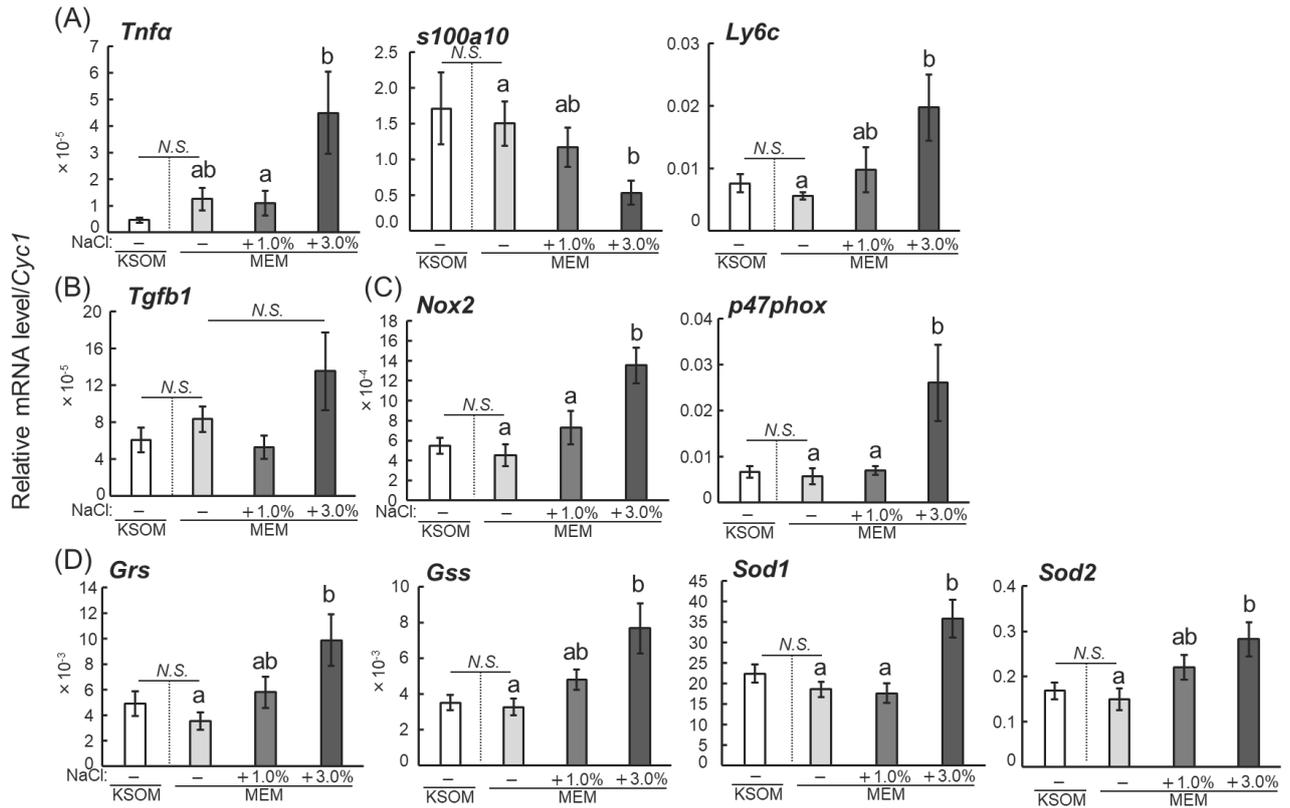


Fig.3 Effects of treating NaCl water after feeding high-fat, high-sucrose diet on the expression of mRNA related to inflammation and oxidative stress in the liver of control and MEM mice with/without NaCl.

The results of each sample were normalized to *Cyc1*. Data are expressed as means \pm standard error of the mean for 7-13 mice. (A) shows inflammation response, (B) shows fibrosis, (C) shows ROS production-related genes, and (D) shows ROS removal-related genes. Statistical analyses were performed by Student's *t*-test between KSOM and MEM control ($*P < 0.05$), and by one-way analysis of variance (ANOVA); post hoc comparisons of multiple groups were carried out using the Tukey-Kramer's multiple comparison test among MEM mice. a-b: Different superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$). KSOM, potassium simplex optimized medium mice; MEM, minimum essential medium mice; N.S., no significant; ROS, reactive oxygen species.

3. 3. 1 塩分水投与による回腸組織の病態へ及ぼす影響

回腸切片を HE 染色し、絨毛構造を観察したところ、塩分投与を行っていない対照 MEM 群では回腸絨毛構造の破綻や絨毛の長さの縮小は見られなかったが、塩分水を投与した軽度塩分群および重度塩分群では観察された (Fig.4)。

3. 3. 2 塩分水投与による小腸(回腸)における免疫応答および腸バリア機能関連遺伝子発現量への影響

回腸における免疫応答関連遺伝子発現量を測定したところ、ROR γ T タンパク質をコードし、Th17 細胞の形成に

関与して細菌や真菌を排除する *Rorc* の遺伝子発現量は、対照 MEM 群および軽度塩分群と比較して重度塩分群で有意に増大した (Fig.5A)。また細菌由来のリポペプチドを認識する受容体の *Tlr-1* の遺伝子発現量は、MEM 対照群群と比較して重度塩分群において有意な減少が示された。

また、腸バリア機能関連遺伝子発現量を測定したところ、ムチンをコードする *Muc4* の遺伝子発現量は、対照 MEM 群と比較して軽度塩分群および重度塩分群で有意に減少した (Fig.5B)。

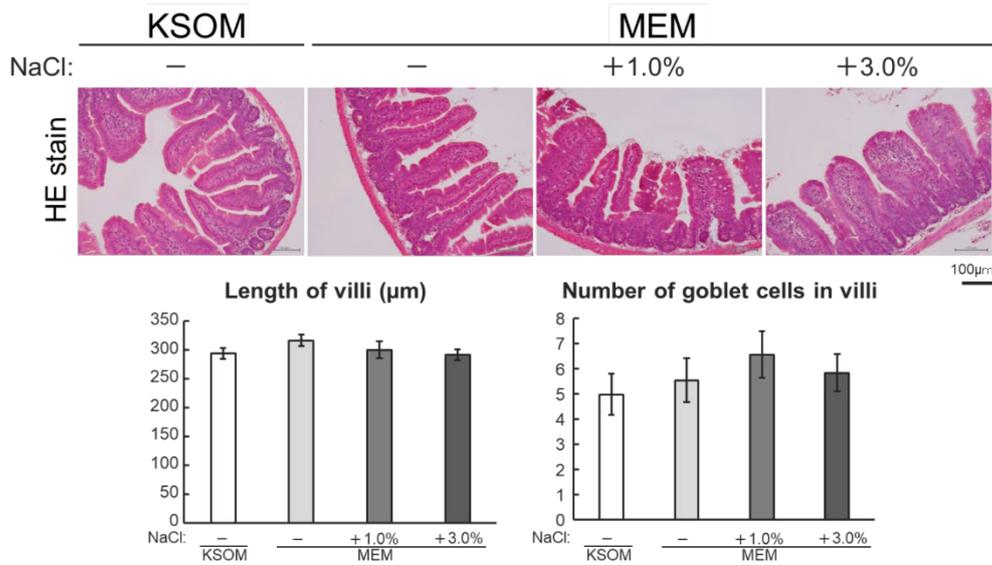


Fig.4 Effects of treating NaCl water after feeding high-fat, high-sucrose diet on the villi structure of the ileum by HE stain in control and MEM mice with/without NaCl.

Images show the liver tissue section was stained HE for 7-13 mice. Data are expressed as means \pm standard error of the mean for 7-13 mice. MEM, minimum essential medium mice; KSOM, potassium simplex optimized medium mice.

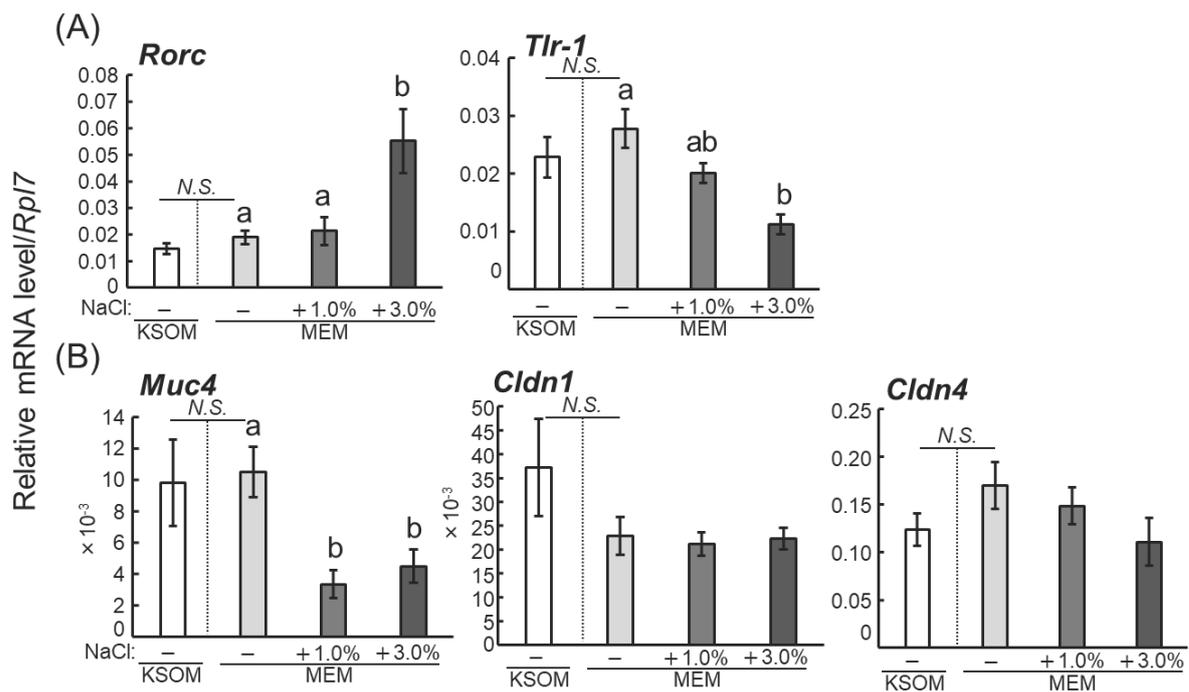


Fig.5 Effects of treating NaCl water after feeding high-fat, high-sucrose diet on the expression of mRNA related to immune response and intestinal barrier function in the ileum of control and MEM mice with/without NaCl.

The results of each sample were normalized to *Rpl7*. Data are expressed as means \pm standard error of the mean for 7-13 mice. (A) shows immune response and (B) shows intestinal barrier function. Statistical analyses were performed by Student's *t*-test between KSOM and MEM control ($*P < 0.05$), and by one-way analysis of variance (ANOVA); post hoc comparisons of multiple groups were carried out using the Tukey-Kramer's multiple comparison test among MEM mice. a-b: Different superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$). KSOM, potassium simplex optimized medium mice; MEM, minimum essential medium mice; N.S., no significant.

4. 考察

本研究では、2 細胞期胚を α MEM 培地もしくは対照 KSOM 培地で体外培養し生まれた MEM マウスおよび対照 KSOM マウスに対して、離乳後に通常食と 10%砂糖水を 1.5 ヶ月投与した後、それぞれのマウスに塩分水を与えない群と、MEM マウスに軽度 (1.0%) の塩分水を与えた群、MEM マウスに重度 (3.0%) の塩分水を与えた群に分け、試験飲料を 1 ヶ月投与する実験を行ったところ、塩分水を投与した MEM マウスへの肝臓における線維化病態が悪化していることが示され、塩分水投与による肝障害が引き起こされていることが明らかとなった。また重度塩分水が投与された MEM マウスにおける解剖時の体重と臓器重量が顕著に減少し、肝臓における糖新生関連遺伝子発現の増大と脂肪合成関連遺伝子発現の減少から、MEM マウスへの重度塩分投与により異化反応が亢進していることが示された。さらに、MEM マウスへの軽度・重度の塩分投与により肝臓におけるマクロファージマーカー Ly6C や炎症性サイトカイン TNF- α 、ROS 産生酵素 NOX2 および p47phox の遺伝子発現増大が観察され、炎症反応や酸化ストレス反応が増大されている可能性が示された。

本研究では、塩分水の投与により肝線維化が増大する傾向が観察された。本研究で用いた MEM マウスは、出生後に高脂肪・高シヨ糖食を約 3 ヶ月投与することで肝臓における線維化病態が進展することを当研究室より報告している⁵⁾。線維化病態は、NAFLD (非アルコール性脂肪性肝疾患) の病態進展において、可逆的な単純性脂肪肝疾患から不可逆的な脂肪肝炎疾患への進展における重要な評価項目であり、線維化病態進展は、ひいては肝硬変、肝がんなど重篤な病態につながるマーカーである⁶⁾。そのため、本研究における塩分水を投与された MEM マウスでは脂肪肝炎疾患が進行した可能性があることが示された。ヒトの NAFLD/NASH (非アルコール性脂肪性肝炎) 進行に関連する病態生理学的、組織学的、分子的、臨床的特徴を示す再現可能な実験動物モデルは存在せず、そのため治療・予防についての研究は進んでいない。現時点での NASH 動物モデルとしてはメチオニンコリン欠乏 (MCD) 食もしくは高脂肪食 (HFD) モデルが使われており、それぞれヒト疾患の組織学的および代謝異常を模倣できるとされているが、HFD モデルでは NAFLD の代謝異常や酸化ストレスおよび炎症の他のマーカー因子を模倣できるも

の、線維症や肝硬変などの進行期には至らないことが報告されている⁷⁾。また、HFD モデル動物では肝臓の組織学的変化は、試験食中止後に回復できる一方、MCD モデル動物では回復できないことや、MCD モデルでは血糖値が低く、さらに血中中性脂肪濃度も低く、HFD モデルよりも肝臓における脂肪蓄積量が少ないことが報告されている⁷⁾。一方、本研究で使用したモデルでは、肝臓での脂肪蓄積や血糖値の上昇が観察され、糖尿病発症後における合併症として脂肪肝炎疾患が発症していることが示された。マウスを用いた先行研究では、NASH 誘導食 (GAN 食; 40 kcal% 脂質, 20 kcal% フルクトース, 2% コレステロール含む。) を食餌投与 26 週間以上経過すると肥満になり、脂肪肝炎症、肝臓の炎症と線維症を発症するが、架橋線維症はまれに 53 週目の後期段階でのみ 10% ほどしか観察されない⁸⁾ ことが示されている。ヒトでは NAFLD 患者は、BARD スコアと FIB-4 で評価した肝線維症を有する被験者は、推定 24 時間尿中ナトリウム値がより高く⁹⁾、2 型糖尿病患者においても、高塩分摂取は NAFLD の存在と関連し肝疾患リスクを高める可能性が示唆されている¹⁰⁾。これらの本研究成果は、ヒトにおいて報告されている糖尿病患者や NASH 患者における過剰塩分水の摂取による肝線維化病態進展による臓器障害リスクの上昇という結果と一致している。すなわち、本研究において、MEM モデルへの過剰塩分水の投与は、慢性炎症悪化により、臓器障害を引き起こすモデル動物であり、さらにこのモデル動物は、ヒトに類似した現象を再現できたモデル動物である可能性が示唆された。

本研究では、高濃度塩分水を投与された MEM マウスの肝臓では、塩分水を投与されていない MEM マウスと比較して、炎症性サイトカイン *Tnfa* や単球/マクロファージマーカー *Ly6c* の遺伝子発現量が増大していたことが明らかとなった。過剰な食事塩分は、免疫系を活性化し、最終的に慢性炎症と高血圧を引き起こすことが知られている¹¹⁾。また、トランスレーショナル研究において、Loperena らは、48 時間の高血圧伸張 (10% 伸張, 1 Hz) を受けたヒト大動脈内皮細胞が、ヒト古典的単球 (CD14⁺/CD16⁻) から中間型単球表現型 (CD14⁺/CD16⁺) への変換を促進し、これが炎症誘発性サイトカイン (IL-6, IL-1 β , IL-23, および TNF- α) を産生し、T 細胞の増殖を促進することが報告されている¹²⁾。さらに、ヒト単球細胞を用いた先行研究では、

高塩分(190 mM NaCl)に曝露すると、ヒト単球は炎症性サイトカイン IL-1 β , TNF- α および IL-6 の分泌を促進し、このナトリウム依存性の単球活性化は、NADPH オキシダーゼによって媒介されることが報告されている¹³⁾。本研究においても、NADPH オキシダーゼで ROS を産生する酵素 *Nox2* や *p47phox* の遺伝子発現が高濃度塩分水を投与された MEM マウスの肝臓において増大していたことから、MEM マウスへの高濃度塩分水の投与により、NADPH オキシダーゼを介して単球が活性化したことで、炎症性サイトカイン TNF- α 発現が増大した可能性が示唆された。また、Ly6C は IFN- γ によって調節される単球・マクロファージおよび内皮細胞の分化抗原として知られているだけでなく、血中から肝臓に浸潤する骨髄由来の Ly-6C(+)単球由来マクロファージは慢性炎症および線維化形成に関与していることが近年報告されている¹⁴⁾。骨髄単球 Ly-6C(+)マクロファージは活性化されて肝臓に浸潤すると、炎症誘発性の表現型に誘導され TNF- α を産生し¹⁵⁾、また線維化メディエーター TGF- β などを介して肝星細胞を活性化し、肝星細胞の分化転換および増殖することで肝線維化を促進する^{14, 16)}ことが報告されている。本研究では、MEM マウスへの高濃度塩分水の投与により、肝臓における線維化病態が進展していたことから、これら先行研究と合わせると、MEM マウスへの高濃度塩分水の投与により、骨髄単球由来 Ly-6C(+)マクロファージが血中から肝臓へ浸潤し、炎症誘発性の表現型に誘導され活性化した単球/マクロファージが、炎症性サイトカイン TNF- α の分泌を促進し、また肝星細胞を活性化して肝線維化が進展した可能性が示唆された。

本研究では、MEM マウスへの塩分水投与により回腸における絨毛構造の破綻が観察され、腸バリア機能関連遺伝子 *Muc4* の発現量が、塩分水非投与のマウスと比較して、塩分水投与のマウスにおいて減少していたことが明らかとなった。さらに、細菌や真菌を排除する Th17 細胞の形成・分化を促す *Rorc* の遺伝子発現量は、塩分水投与により増大し、病原体を検知する *Tlr-1* の遺伝子発現量は減少することが示された。大腸が水分や吸収に関わる遺伝子群を高発現しているのに対し、回腸末端では白血球、T 細胞の活性化や分化に関わる遺伝子群を高発現していることから、回腸は免疫システムが発達している消化

管であることが示されている¹⁷⁾。実際に回腸では TLR1 の mRNA 量が多いことが知られており¹⁸⁾、この TLR1 シグナル伝達は粘膜免疫応答の初期段階(抗原提示細胞の活性化、抗菌ペプチド産生)に重要であるため、その発現低下により、病原体の検知能力が低下し、免疫応答の初期段階が阻害される可能性が示唆されている¹⁹⁾。これによりパイエル板や M 細胞を介した抗原取り込みが減少し、腸管免疫系の活性化が遅延する可能性が示されている。本研究結果と合わせると、MEM マウスへの塩分水投与は、TLR1 は発現を低減させ、回腸における免疫応答の初期応答が阻害されている可能性が示唆された。また ROR γ T は、Th17 細胞の分化に必須な転写因子であり、IL-17A/F の産生が促進され、粘膜炎症が増強されることが報告されている^{20, 21)}。さらに、過剰な IL-17A は、好中球浸潤の誘導や、腸上皮細胞のタイトジャンクションタンパク質の発現を抑制し、腸管透過性を亢進させることで、クローン病などの炎症性腸疾患の発症リスクを高める可能性が示されている²²⁾。本研究結果と合わせると、MEM マウスへの塩分水投与は異物応答の初期段階の免疫応答が減弱し、Th17 細胞分化増大による IL-17 を中心とした腸管透過性が亢進することで、回腸の構造が破綻する可能性が示された。

したがって、本研究によって、出生前後の劣悪な栄養環境に加え、過剰塩分といったさらなる炎症反応増大刺激が加わると、回腸の絨毛構造の破綻に加え、肝臓における脂肪肝疾患の増悪が誘導され、重篤化する可能性があることが示唆された。さらに、本研究において、MEM モデルの塩分過剰摂取は、慢性炎症悪化により、臓器障害を引き起こすモデル動物であり、ヒトに類似した現象を再現できたモデル動物である可能性が示唆された。

5. 今後の課題

本研究では、塩分水投与実験において、3.0%塩分水投与群では投与後 1 ヶ月で死亡率が 12.5%と高く、塩分水投与後 3 ヶ月では 3.0%塩分水投与群は全て死亡した。これは塩分濃度が、設定した観察期間に対して高かったと考えられ、塩分投与による炎症悪化現象は観察されたものの、敗血症状態による身体の脆弱化による異化亢進が中心となる現象が捉えられた。今後、塩分濃度の調節や塩分水を塩分食にすることで急速に塩分を吸収する

のを防ぐことで、塩分投与によるサイトカインストームの悪化や臓器障害の増悪メカニズムについて解明できる可能性があると考えられる。加えて、本研究では、回腸のバリア機能の低下や免疫応答異常の可能性が観察されたが、回腸と肝臓の臓器障害のつながりについては未解明である。さらに塩分水投与後1ヶ月で解剖を行ったが、より短期での観察により、慢性的な刺激による慢性炎症反応と肝障害との関連を観察することができなかった。今後の研究において、塩分水投与の期間を長期にすることにより、ヒトと同様の環境、すなわち慢性的な過剰塩分水摂取による影響を検証していく必要がある。

6. 文献

1. D J P Barker, The origins of the developmental origins theory, *J Intern Med.* 261(5):412-7. 2007.
doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01809.
2. Kishigami S., Mochizuki K., Wakayama T. The method for producing diabetic animal model and the diabetic animal model. Japanese Patent No. 7169509, 2020 (in Japanese).
3. Ishiyama, S., Kimura, M., Nakagawa, T., Fujimoto, Y., Uchimura, K., Kishigami, S. and Mochizuki, K. Development of the diabetic kidney disease mouse model culturing embryos in alpha-minimum essential medium in vitro, and feeding barley diet attenuated the pathology. *Frontiers in endocrinology.* 12: 746838. 2021.
4. Ishiyama, S., Kimura, M., Umihira, N., Matsumoto, S., Takahashi, A., Nakagawa, T., Wakayama, T., Kishigami, S. and Mochizuki, K. Mice derived from in vitro alphanem-cultured preimplantation embryos exhibit postprandial hyperglycemia and higher inflammatory gene expression in peripheral leukocytes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry.* 85: 1215-1226. 2021.
5. Ishiyama, S., Kimura, M., Umihira, N., Matsumoto, S., Takahashi, A., Nakagawa, T., Wakayama, T., Kishigami, S. and Mochizuki, K. Consumption of barley ameliorates the diabetic steatohepatitis and reduces the high transforming growth factor beta expression in mice grown in alpha-minimum essential medium in vitro as embryos. *Biochemistry and biophysics reports.* 27: 101029. 2021.
6. Cohen, J.C., Horton, J.D. and Hobbs, H.H.: Human fatty liver disease: Old questions and new insights. *Science.* 332: 1519-1523.(2011).
7. Alshawsh, M.A., Alsalahi, A., Alshehade, S.A., Saghir, S.A.M., Ahmeda, A.F., Al Zarzour, R.H. and Mahmoud, A.M.: A comparison of the gene expression profiles of non-alcoholic fatty liver disease between animal models of a high-fat diet and methionine-choline-deficient diet. *Molecules.* 27.(2022).
8. Taconic Biosciences, I.: Taconic is the first and only vendor to offer a diet-induced nash mouse model off the shelf.(2024).
<https://www.taconic.com/products/mouse-rat/diet-induced-mice/diet-induced-nash-b6>
9. Huh, J.H., Lee, K.J., Lim, J.S., Lee, M.Y., Park, H.J., Kim, M.Y., Kim, J.W., Chung, C.H., Shin, J.Y., Kim, H.S., Kwon, S.O. and Baik, S.K.: High dietary sodium intake assessed by estimated 24-h urinary sodium excretion is associated with nafld and hepatic fibrosis. *PloS one.* 10: e0143222.(2015).
10. Takahashi, F., Hashimoto, Y., Kaji, A., Sakai, R., Kawate, Y., Okamura, T., Kitagawa, N., Okada, H., Nakanishi, N., Majima, S., Osaka, T., Senmaru, T., Ushigome, E., Hamaguchi, M. and Fukui, M.: The association of salt intake and non-alcoholic fatty liver disease in people with type 2 diabetes: A cross-sectional study. *Frontiers in nutrition.* 9: 943790.(2022).
11. Madhur, M.S., Elijovich, F., Alexander, M.R., Pitzer, A., Ishimwe, J., Van Beusecum, J.P., Patrick, D.M., Smart, C.D., Kleyman, T.R., Kingery, J., Peck, R.N., Laffer, C.L. and Kirabo, A.: Hypertension: Do inflammation and immunity hold the key to solving this epidemic? *Circulation research.* 128: 908-933.(2021).

12. Loperena, R., Van Beusecum, J.P., Itani, H.A., Engel, N., Laroumanie, F., Xiao, L., Eljovich, F., Laffer, C.L., Gnecco, J.S., Noonan, J., Maffia, P., Jasiewicz-Honkisz, B., Czesnikiewicz-Guzik, M., Mikolajczyk, T., Sliwa, T., Dikalov, S., Weyand, C.M., Guzik, T.J. and Harrison, D.G.:Hypertension and increased endothelial mechanical stretch promote monocyte differentiation and activation: Roles of stat3, interleukin 6 and hydrogen peroxide. *Cardiovascular research*. 114: 1547-1563.(2018).
13. Ruggeri Barbaro, N., Van Beusecum, J., Xiao, L., do Carmo, L., Pitzer, A., Loperena, R., Foss, J.D., Eljovich, F., Laffer, C.L., Montaniel, K.R., Galindo, C.L., Chen, W., Ao, M., Mernaugh, R.L., Alsouqi, A., Ikizler, T.A., Fogo, A.B., Moreno, H., Zhao, S., Davies, S.S., Harrison, D.G. and Kirabo, A.:Sodium activates human monocytes via the nadph oxidase and isolevuglandin formation. *Cardiovascular research*. 117: 1358-1371.(2021).
14. Tacke, F. and Zimmermann, H.W.:Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *Journal of hepatology*. 60: 1090-1096.(2014).
15. Luedde, T. and Schwabe, R.F.:Nf-kappab in the liver-linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*. 8: 108-118.(2011).
16. Karlmark, K.R., Weiskirchen, R., Zimmermann, H.W., Gassler, N., Ginhoux, F., Weber, C., Merad, M., Luedde, T., Trautwein, C. and Tacke, F.:Hepatic recruitment of the inflammatory gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology*. 50: 261-274.(2009).
17. Ikuta, S., Saito, Y., Takata, S., Nakatani, Y., Nagatomo, I., Shiba, S., Takeda, Y., Totoki, Y., Mizutani, S., Sunakawa, H., Ikematsu, H., Takamaru, H., Kumanogoh, A. and Yachida, S.:Variability in non-tumor areas of colorectal cancer patients as revealed by endoscopic intestinal step biopsies. *Molecular cancer*. 23: 249.(2024).
18. Ghaffari, M.H., Sadri, H., Steinhoff-Wagner, J., Hammon, H.M. and Sauerwein, H.:Effects of colostrum feeding on the mrna abundance of genes related to toll-like receptors, key antimicrobial defense molecules, and tight junctions in the small intestine of neonatal dairy calves. *Journal of dairy science*. 104: 10363-10373.(2021).
19. Abreu, M.T., Fukata, M. and Arditi, M.:Tlr signaling in the gut in health and disease. *J Immunol*. 174: 4453-4460.(2005).
20. Kumar, R., Theiss, A.L. and Venuprasad, K.:Rorgammat protein modifications and il-17-mediated inflammation. *Trends in immunology*. 42: 1037-1050.(2021).
21. Eberl, G.:Rorgammat, a multitask nuclear receptor at mucosal surfaces. *Mucosal immunology*. 10: 27-34.(2017).
22. Schmitt, H., Neurath, M.F. and Atreya, R.:Role of the il23/il17 pathway in crohn's disease. *Frontiers in immunology*. 12: 622934.(2021).
23. Kumar, R., Theiss, A.L. and Venuprasad, K.:Rorgammat protein modifications and il-17-mediated inflammation. *Trends in immunology*. 42: 1037-1050.(2021).

Manipulation of the Embryonic Environment - Generation of a Human-Like Hypertensive Nephropathy Model by Excess Salt Ingestion into MEM Mice Model of Diabetic Nephropathy

Shiori Ishiyama

University of Yamanashi, Faculty of Life and Environmental Sciences

Summary

Objective: Effective treatment and prevention of chronic kidney disease (CKD) remain undeveloped, in part due to the lack of animal models that can reproduce the human condition. Recently, we have successfully created a mouse model of diabetic kidney disease (DKD) by combining in vitro culture of preimplantation embryos in a specific culture medium and subsequent environmental manipulation of their diet after birth, as in humans. The aim of this study was to create a model of CKD that spontaneously develops due to excessive salt intake using embryonic environment manipulation MEM mice and to establish a model in which the pathogenesis can be observed.

Methods: MEM mice cultured in vitro in α MEM medium (control: KSOM) during embryogenesis and allowed to give birth were treated with 10% sugar water for 1.5 months immediately after weaning. After that, the following test solutions were administered *ad libitum* for 1 month: 1) control KSOM mice without additional salt and 2) MEM mice, 3) MEM mice receiving 1.0% NaCl solution (mild-salt group), and 4) MEM mice receiving 3.0% NaCl water (severe-salt group).

Results: In pathological evaluation of liver, progression of liver fibrosis was observed in the perivascular area in the mild-salt and severe-salt groups. Inflammation-related gene expression in the liver was significantly increased in the severe-salt group compared to the mild-salt group for *Tnfa* and the control MEM group for *Ly6c*. HE staining of ileum sections showed disruption of villi structure in the mild-saline and severe-saline groups. *Muc4* gene expression related to intestinal barrier function in the ileum was significantly decreased in the mild-salt and severe-salt groups compared to the control MEM group.

Discussion: This study suggests that the poor nutritional environment before and after birth, additional stimuli that increase inflammatory response, such as excess salt intake, may induce and exacerbate steatohepatitis, in addition to disruption of ileum villi structure, which may lead to severe disease. This model resembles the human phenomenon, suggesting that it may be a model animal that causes organ damage due to exacerbation of chronic inflammation.