

令和元年5月16日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11054

研究課題名(和文) 尿路結石溶解療法を目指したマクロファージ関連分子のオミックス解析

研究課題名(英文) Omics analysis of macrophage-related molecules for urolithiasis dissolution therapy

研究代表者

田口 和己 (Taguchi, Kazumi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：00595184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：尿路結石に形成にマクロファージの働きが重要であることを私達は報告してきた。本研究ではその中で、炎症に抑制的に働くM2型のマクロファージに着目し、尿路結石形成に対する影響を調べた。腎組織の中で結石前駆病変となる石灰化の周囲では、M2型マクロファージの発現が低下しており、尿路結石症の患者の尿でも、M2型マクロファージの働きが低下していることが分かった。さらにマウスモデルにおいて、M2型マクロファージへの治療が腎結石の形成を抑制することが分かった。本研究により、M2型マクロファージを利用した新規治療への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで有効な薬物治療がなかった尿路結石症に対して、M2型マクロファージによる結晶貪食作用を利用し、結石溶解治療への可能性を示したものである。この研究成果は、再発予防に有用だけでなく、将来的に現在主流となっている外科的治療に取って代わるものとなりうる可能性を秘めている。尿路結石症の生涯罹患率が今や10%に達成している現状を鑑みると、治療法の躍進につながる発見と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that the relationship between renal stone formation and macrophage. In this study, we focused on the phenotype of macrophage, in particular, M2-type anti-inflammatory macrophages and performed functional analyses for stone formation. The M2-type macrophage was less expressed in renal papilla plaque, a precursor of stone, as well as urine sample in kidney stone patients compared with controls. More importantly, the treatment of M2-type macrophage in a stone model mouse demonstrated the suppression effect for stone development. These results indicate that potential therapeutic use of M2-type macrophage for kidney stone disease.

研究分野：泌尿器科

キーワード：尿路結石症 マクロファージ 結晶貪食 溶解治療

1. 研究開始当初の背景

(1). 本研究に関連する国内・国外の研究動向および位置付け

わが国の尿路結石生涯罹患率は、男性では100人中約15人にも達し、5年再発率は40~50%と難治性である。しかし予防治療薬として新たに認可された薬剤はなく、形成機序の解明と再発予防法の確立が急がれる。これまでの尿路結石の予防法は飲水と食事療法を中心とした、尿中の無機物質の制御が中心であったが、発症率はこの40年間で約3倍と増加しており、経済を圧迫する社会問題になっている。そこで私たちは、結石成分の数%を占める有機物質(結石マトリックス)に着目し、尿路結石に遺伝的要因が強く関与することを明らかにし、培養細胞・動物モデルを用いた結石形成機序の解明に取り組んできた。

(2). これまでの研究成果を踏まえ、着想に至った経緯

①結石モデルマウスによる結石消失現象とMφによる貪食作用

私たちは、遺伝学的環境変化を明らかにするために、従来の結石モデルラットではなく、遺伝子改変技術のあるマウスを用い尿路結石モデルを確立した。その過程において、「腎結石が自然消失する」という興味深い現象を捉えることに成功した。またこの現象の中で、腎結石の形成に伴い腎間質のMφ数が増加すること、透過型電子顕微鏡の観察から、Mφが結晶を貪食している像を発見した。これらの結果をふまえ、私たちは、この微小結石消失現象のメカニズムを解明するためマイクロアレイ解析を行い、尿路結石の消失には①腎尿細管細胞への結晶の付着、②結晶塊の間質移行、③ケモカイン・M-CSF(macrophage-colony stimulating factor)などのMφ走化因子発現、④単球の走化および分化・血管内皮細胞との接着、⑤Mφの成熟・貪食・細胞内消化・抗原提示・TGF-β産生という、メカニズムを推測した。

②2つの極性(M1・M2)Mφの存在

Mφには、炎症に促進的に働くM1Mφと、抑制的に働くM2Mφといった2つの極性が存在する。尿路結石との共通点が多いことで知られる動脈硬化において、M1Mφが促進に、M2Mφが抑制に係わると報告されている。以上より、腎には自然消失という結石を防御する機能が存在すると考えられ、M1Mφが形成(③,④)、M2Mφが消失(⑤,⑥)に係わることが推察された(図1)。

(3). これまでの研究成果に基づいた研究状況

M1・M2Mφと尿路結石形成量の関連観察

私たちはM-CSFが欠損したM2Mφ機能不全マウスを用いて腎結石形成実験を行った。その結果、M2Mφ機能不全マウスでは腎結石量は野生型より有意に多かった。またM-CSFの補充によりM2Mφの発現が増加し、腎結石の形成量は低下した(図2)6)。さらに私たちは、メタボリックシンドロームモデルであるob/obマウスでは、高シュウ酸および脂質負荷によりM1Mφが増加し、腎結石の形成を認めることを明らかにした7)。このことから、M1MφとM2Mφは腎結石形成をそれぞれ促進/抑制する機能を有する可能性を私たちは見いだした。また結石関連遺伝子のノックアウトマウスおよび薬剤投与ラットを用いた研究においても、尿路結石形成過程にMφが重要な機能を有する可能性を示している。

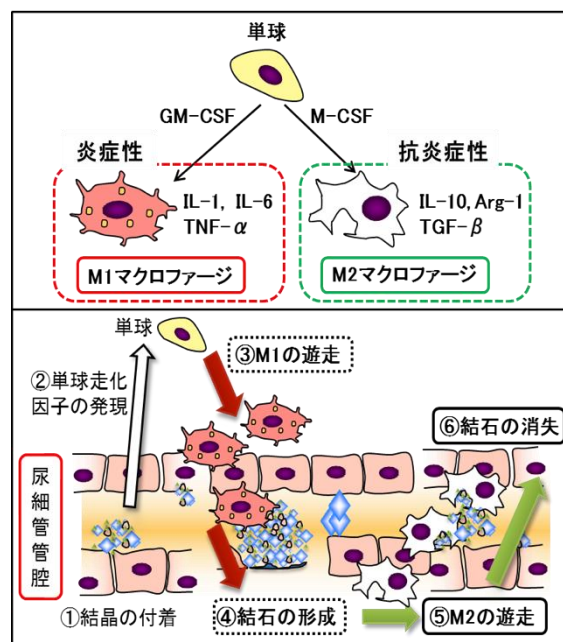


図1. M1・M2Mφと結石形成における働き

2. 研究の目的

私たちはこれまでに、抗炎症性Mφ(Mφ)M2が尿路結石の形成を抑制することを発見した。これに対し炎症性MφであるM1は結石形成を促進する可能性も示した。この点に着目し、私たちは、Mφの極性が尿路結石の形成機序における働きを決定するのではないかと推察した。そこで本研究では、項目3.の方法により、Mφおよび関連分子による尿路結石の制御機構を解明し、結石の溶解療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

[1] ヒト腎乳頭部石灰化周囲組織のオミックス解析

名古屋市立大学病院にて、上部尿路結石にて内視鏡的破碎術を施行する患者と、精査目的で尿管鏡を行う非結石患者の腎乳頭組織(Randall's plaque部位と正常粘膜部位)を採取する。また外来通院する患者を、尿路結石患者と非結石患者に分け、随時尿を採取する。それぞれ、①RNAシーケンスによるTranscriptome解析、抽出した蛋白から②MAGPIX®マルチプレックスシステムによるProteome解析を行う。

[2] 結石モデルマウスを用いた骨髄由来Mφの投与による尿路結石形成の抑制

8週齢雄のC57BL/6Jに対し、結石モデルマウスの手法に順じ、シュウ酸前駆物質グリオキシル酸(GOx) 80mg/kgを6日間腹腔内投与を行う。また同マウスから採取した骨髄由来Mφをさらに関連分子により結石形成抑制系に分化誘導させ、PBSを対照に、1.0x10⁶個/bodyを尾静脈から単回投与する。6日目に腎検体・血液の採取と24時間蓄尿を行う。血液検体および尿検体は、結石関連無機物質およびMAGPIX®により解析する。腎結石形成は、シュウ酸カルシウム染色(Pizzolato染色)と偏光顕微鏡により同定し、画像解析ソフトで(Image Pro Plus®)で定量化する。腎Mφをフローサイトメトリー、免疫染色、および定量PCRによって同定する。

4. 研究成果

[1] ヒト腎乳頭部石灰化周囲組織のオミックス解析

① RNA シーケンスによる ② Mφ関連遺伝子の発現比較

Transcriptome 解析

電子顕微鏡による分析から、RPはOPNの著明な発現を示し、周囲はコラーゲンに覆われていた。Plaque群では、Mφ関連遺伝子のうち炎症性のM1Mφ関連遺伝子の発現が高値で、抗炎症性のM2Mφ関連遺伝子の発現が低値であった(図2)。

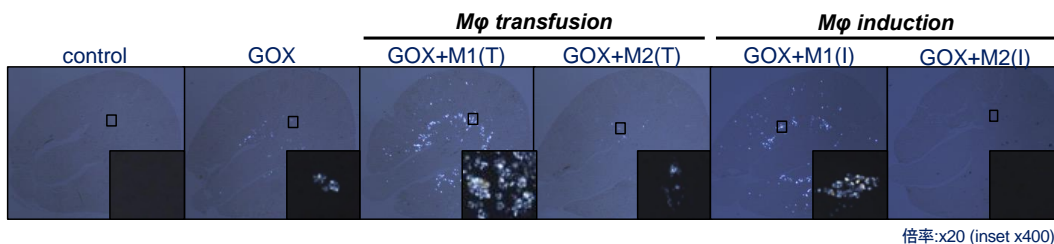
GeneSpring・IPAによる解析から、Plaque群では正常群と比べ、好中球・Mφ・炎症に関わる遺伝子(LCN2, IL11, SLP1, MMD)の高発現と、Na・K・水チャネルに関わる遺伝子(SLC12A1, NALCN, AQP1)の低発現を認めた。免疫染色において、これらの遺伝子発現は尿路上皮および周囲の間質細胞にて障害がみられた。CaOx結石の発症に、炎症・免疫細胞およびNa・K・水チャネルを介した遺伝子ネットワークが関わっていることが示唆された(図3)。

②MAGPIX®マルチプレックスシステムによる Proteome 解析

尿路結石患者は66名であり、うち初発群が24名、再発群が42名であった。また非結石患者は56名であった。マルチプレックス解析の結果、初発および再発を含む尿路結石患者群では、非結石患者群に比べ、M1Mφ関連タンパクであるGROα(CXCL1: chemokine (C-X-C motif) ligand 1)およびMCP-1(monocyte chemoattractant protein-1)の発現が高く、M2Mφ関連タンパクであるIL-4(interleukin 4)の発現が低いことが分かった。

これらの結果は尿路結石患者の腎乳頭部石灰化部位周囲の粘膜に遺伝子発現のtranscriptome解析において、結石患者の粘膜ではM2Mφ関連遺伝子群の発現が低かったことと一致しており、M2Mφ発現が結石形成に関わることが、RNA・タンパクレベルで明らかになった。

図4. 腎結石形成量の比較



[2] 結石モデルマウスを用いた骨髄由来Mφの投与による尿路結石形成の抑制

結石対象群に比べ、M2群では腎結石形成量が減少、M1群では腎結石形成量は増加していた(図4)。M2群ではF4/80+CD11b+CD163+CD206+cellの増加に伴い、OPN、MCP-1、IL-6、TNF-αの発現が低下した。研究2) M1に比べM2Mφの結晶貪食能は高く、M2Mφとの共培養により尿細管上皮細胞の結晶付着率は低下した。

腎結石の形成に、M1Mφが促進、M2Mφが抑制に働く機序を解明した。M1からM2Mφへの誘導

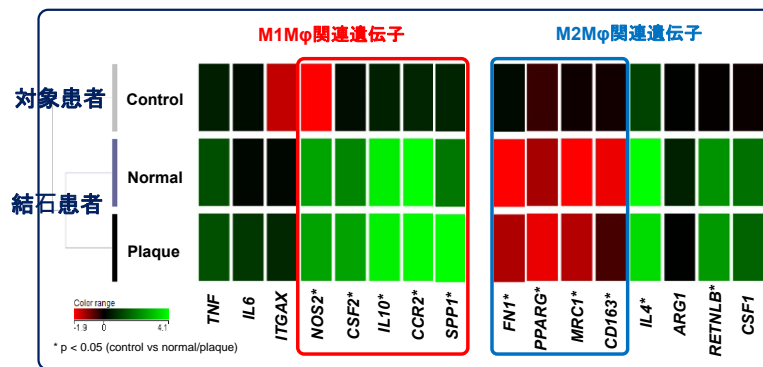
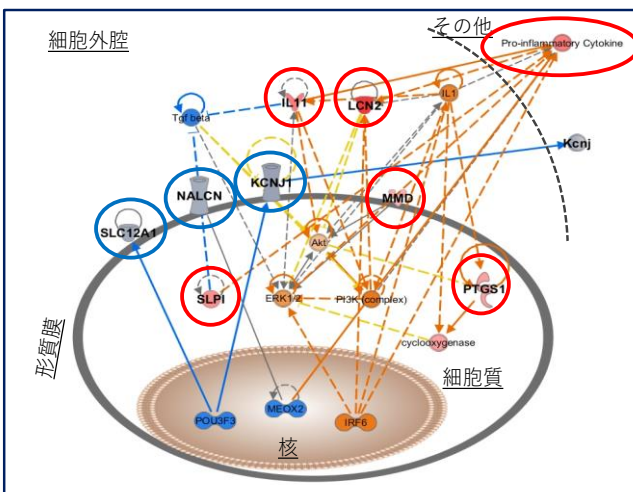


図3. 腎乳頭部Plaque形成に関わる遺伝子ネットワーク



による、新たな結石治療法の基礎データを確立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Taguchi K, Hamamoto S, Okada A, Sugino T, Unno R, Ando R, Gao B, Tozawa K, Kohri K, Yasui T: Helper T-cell signaling and inflammatory pathway lead to formation of calcium phosphate but not calcium oxalate stones on Randall's plaques. *Int J Urol*. 2019 [Epub ahead of print]
2. Okada A, Ando R, Taguchi K, Hamamoto S, Unno R, Sugino T, Tanaka Y, Mizuno K, Tozawa K, Kohri K, Yasui T: Identification of new urinary risk markers for urinary stones using a logistic model and multinomial logit model. *Clin Exp Nephrol*. 2019 Jan 18. [Epub ahead of print]
3. Usami M, Okada A, Taguchi K, Hamamoto S, Kohri K, Yasui T. Genetic differences in C57BL/6 mouse substrains affect kidney crystal deposition. *Urolithiasis*. 46(6):515-522, 2018.
4. Okada A, Hamamoto S, Taguchi K, Unno R, Sugino T, Ando R, Mizuno K, Tozawa K, Kohri K, Yasui T. Kidney stone formers have more renal parenchymal crystals than non-stone formers, particularly in the papilla region. *BMC Urol*. 12;18(1):19, 2018.
5. Taguchi K, Hamamoto S, Okada A, Unno R, Kamisawa H, Naiki T, Ando R, Mizuno K, Kawai N, Tozawa K, Kohri K, Yasui T: Genome-wide gene expression profiling of Randall's plaques in calcium oxalate stone formers. *J Am Soc Nephrol*. 28:333-347, 2017.
6. Taguchi K, Usawachintachit M, Hamamoto S, Unno R, Tzou DT, Sherer BA, Wang Y, Okada A, Stoller ML, Yasui T, Chi T. Optimizing RNA Extraction of Renal Papilla Biopsy Tissue in Kidney Stone Formers: A New Methodology for Genomic Study. *J Endourol*. 31:922-929, 2017.
7. Taguchi K, Yasui T, Milliner DS, Hoppe B, Chi T. Genetic Risk Factors for Idiopathic Urolithiasis: A Systematic Review of the Literature and Causal Network Analysis. *Eur Urol Focus*. 3:72-81, 2017.
8. Taguchi K, Okada A, Hamamoto S, Unno R, Moritoki Y, Ando R, Mizuno K, Tozawa K, Kohri K, Yasui T. M1/M2-macrophage phenotypes regulate renal calcium oxalate crystal development. *Sci Rep*. 6:35167, 2016.
9. Tzou DT, Taguchi K, Chi T, Stoller ML. Animal models of urinary stone disease. *Int J Surg*. 36:596-606, 2016.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Taguchi Kazumi, Chen L, Usawachintachit Manint, Hamamoto Shuzo, Kang M, Unno Rei, Tzou David, Sherer Benjamin, Yasui Takahiro, Ho S, Stoller Marshall, Chi Thomas: Discovery of fatty acid binding protein 4 as an essential molecule for the development of kidney stones: A new understanding of the relationship between obesity and nephrolithiasis. 34th Annual EAU Congress, 2019.3.15-19, Barcelona, Spain
2. 田口 和己, 濱本 周造, 岡田 淳志, 安井 孝周: 腎乳頭部 Randall's Plaque の遺伝子発現解析からみる分子標的治療の可能性。第 83 回日本泌尿器科学会東部総会、2018 年 10 月 14 日、東京都
3. 田口 和己, 杉野 輝明, 海野 怜, 藤井 泰普, 濱本 周造, 安藤 亮介, 岡田 淳志, Marshall Stoller, Thomas Chi, 郡 健二郎, 安井 孝周: CaOx 結石形成に関わる Fatty Acid Binding Protein 4 の同定。日本尿路結石学会第 28 回学術集会、2018.8.24-25、大阪市
4. Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Unno Rei, Tanaka Yutaro, Sugino Teruaki, Ando Ryosuke, Okada Atsushi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Pro-inflammatory and immune-active responses predominantly leading to Randall's plaque formation on calcium phosphate stone. American Urological Association Annual Meeting 2018, 2018.5.18-21, San Francisco, USA
5. 田口 和己: マクロファージのオミックス解析に基づく分子標的手法を用いた尿路結石溶解療法。第 18 回 AKUA 学術集会、2018.3.9、東京都
6. 田口 和己, 濱本 周造, 岡田 淳志, 安井 孝周: 尿路結石形成機構の解明と溶解治療への挑戦。第 67 回日本泌尿器科学会中部総会、2017.11.24-27、大阪市
7. Taguchi Kazumi, Usawachintachit Manint, Tzou T David, Hamamoto Shuzo, Sherer A Benjamin, Stoller L Marshall, Yasui Takahiro, Chi Thomas: Optimizing RNA extraction of renal papilla biopsy tissue in kidney stone formers: a new methodology for genomic study. The 35th World Congress of the Endourology (WCE2017), 2017.9.12-16, Vancouver, Canada
8. 田口 和己, 濱本 周造, 岡田 淳志, 戸澤 啓一, 安井 孝周: カルシウム結石溶解へ挑戦。日本尿路結石症学会第 27 回学術集会、2017.8.25-26、豊中市
9. Taguchi Kazumi, Okada Atsushi, Unno Rei, Fujii Yasuhiro, Hirose Yasuhiko, Usami Masayuki, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Different roles of M1/M2 macrophage phenotype for renal crystal formation. American Urological Association Annual Meeting 2016, 2016.5.6-10, San Diego, USA
10. Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Okada Atsushi, Unno Rei, Kamisawa Hideyuki, Naiki Taku, Ando Ryosuke, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Discovery of Randall's plaque gene expression profiling in calcium oxalate stone formers by immunohistochemical genome-wide analysis. American Urological Association Annual Meeting 2016, 2016.5.6-10, San Diego, USA
11. Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Unno Rei, Kamisawa Hideyuki, Ando Ryosuke, Okada Atsushi, Umemoto Yukihiro, Kamiya Hiroyuki, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Discovery of a gene expression profile contributing to renal papillary calcification as Randall's plaques by genome-wide analysis 第 104 回日本泌尿器

科学会総会、2016.4.23-25、仙台市

〔図書〕（計 6 件）

1. 田口 和己、杉野 輝明、海野 怜、藤井 泰普、濱本 周造、安藤 亮介、岡田 淳志、安井 孝周：特集Ⅱ M2 マクロファージと疾患 腎結石。臨床免疫・アレルギー科、70(1):53-59、科学評論社、2018
2. 田口 和己、濱本 周造、岡田 淳志、安井 孝周：特集 尿路結石診療の現状と新展開 形成機序解明の最前線。泌尿器外科、29(9):1433-1438、2016
3. 田口 和己、岡田 淳志、安井 孝周：話題 マクロファージと尿路結石。腎臓内科・泌尿器科、4(3):254-260、2016
4. 田口 和己、海野 怜、岡田 淳志、安井 孝周：特集 脂質代謝と腎泌尿器科疾患 尿路結石と脂質代謝。腎臓内科・泌尿器科、4(6):564-569、2016
5. 田口 和己、岡田 淳志、神谷 浩行、安井 孝周：Current Knowledge 6 マクロファージによる結石の溶解療法。泌尿器 Care&Cure Uro-Lo、21(6):101-108、2016

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等：該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：郡 健二郎

ローマ字氏名：(KOHRI kenjiro)

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：その他部局等

職名：学長

研究者番号（8桁）：30122047

研究分担者氏名：安井 孝周

ローマ字氏名：(YASUI takahiro)

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：40326153

研究分担者氏名：戸澤 啓一

ローマ字氏名：(TOZAWA keiichi)

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：40264733

研究分担者氏名：岡田 淳志

ローマ字氏名：(OKADA atsushi)

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：70444966

研究分担者氏名：濱本 周造

ローマ字氏名：(HAMAMOTO shuzo)

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：講師

研究者番号（8桁）：80551267

(2) 研究協力者：該当者なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。