

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16714

研究課題名(和文)最終糖化産物が尿路結石形成に及ぼす分子機構の解明とバイオマーカーの探索

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of advanced glycation ends products on urinary stone formation and exploration of their potential as biomarkers

研究代表者

井上 慎也 (INOUE, Shinya)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：20740997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラットを用いた動物実験で、果糖ブドウ糖液糖(High Fructose Corn Syrup: HFCS)の過剰摂取が誘導する腎臓の遺伝子変動をDNA microarrayを用いて解析した。またHFCS摂取によって血清TAGEの上昇と肝臓組織内TAGEの蓄積を明らかにした。HFCS摂取によって腎臓で誘導される遺伝子の内、Usp2とCalb1の遺伝子変動は肝臓組織内TAGEと相関することを見出した。これらの結果は、肝臓と腎臓の間に、直接的または間接的に働くエクソソームやサイトカインなどのシグナル伝達メディエーターを介する臓器間ネットワークが存在する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

果糖ブドウ糖液糖(High Fructose Corn Syrup: HFCS)の過剰摂取が腎臓での遺伝子発現を誘導することを見出した。それらの遺伝子発現は肝臓組織内TAGEと相関し、RAGEを介さないTAGEの直接作用や、メディエーターを介した腎臓と肝臓の間に臓器間ネットワークが存在する可能性が示唆された。これらの結果は、HFCS過剰摂取が体内に及ぼす影響とTAGEを介した生活習慣病発症の解明に意義のある基礎研究である。

研究成果の概要(英文)：In animal experiments using rats, we analyzed the genetic changes in the kidneys induced by excessive intake of high fructose corn syrup (HFCS) using DNA microarray. We also found that excessive HFCS intake contributed to the increase in serum TAGE and the accumulation of TAGE in liver tissue. Among the genes induced in the kidneys by HFCS, we found that genetic changes in Usp2 and Calb1 were correlated with TAGE in liver tissue. Changes in specific gene expression profiles in the kidney were more correlated with TAGE levels in the liver tissue than in the serum. These findings suggest a direct or indirect interaction may be present between the liver and kidneys that does not involve serum TAGE or RAGE. The involvement of internal signal transduction factors such as exosomes or cytokines is suggested to contribute to the observed changes in kidney gene expression.

研究分野：尿路結石症

キーワード：High fructose corn syrup TAGE 腎臓 生活習慣病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームに伴う高血糖や、食事由来の終末糖化産物(Advanced Glycation End products: AGEs)過剰摂取などにより、生活習慣病が増加している。最終糖化産物は生活習慣病の主因と考えられているが、その中でも糖代謝中間体に由来するグリセルアルデヒド由来のAGEs (glyceraldehydederived AGEs: Glycer-AGEs)は toxic AGEs (TAGE)と呼ばれる。食後高血糖、果糖及び食事性 AGEs の過剰摂取により体内で生成され、高い細胞傷害性と AGE 受容体を介した酸化ストレスの亢進を呈する。

我が国における尿路結石罹患率は全国疫学調査から急増しており、また、好発年齢が高齢化していることが明らかになった。この治療に要する費用、特に外科的治療費が増加しており医療経済の観点からも尿路結石の発生機序の解明と発生阻止および再発予防が必要であるが発生機序の解明には至っていない。

### 2. 研究の目的

我が国における尿路結石全国疫学調査の結果から尿路結石は生活習慣病の1つと考えられているが、その発症機序は未だに解明されていない。また砂糖や果糖ブドウ糖液糖(High Fructose Corn Syrup: HFCS)の過剰摂取の習慣は、肝細胞内での果糖の代謝中間体であるグリセルアルデヒドの生成量を増やし、これに付随して生体内での血中 TAGE レベルの上昇が起こる。各組織における TAGE-RAGE 系が増悪し生活習慣病の発症・進展すると考えられる。

すなわち、尿路結石症の発症にはこれまで未知であった糖代謝中間体のグリセルアルデヒド由来 AGEs すなわち TAGE が RAGE を介して腎尿細管細胞から結石関連分子の発現やアポトーシス、酸化ストレスなどのトリガーとなること、あるいはその下流に存在する NF- $\kappa$ B を活性化などのシグナルトランスリダクションを誘発して尿路結石形成を促進する可能性が示唆される。尿路結石発症に関わる TAGE-RAGE (Receptor of AGEs) 系の役割を解明することを目的とする。また尿路結石形成と再発のバイオマーカーとして TAGE の可能性を探索することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 結石形成モデルラットの作成

11週齢の wister rat を飼育環境 (day: night=12hr:12hr 24度の一定環境下) に1週間順化の後、シュウ酸前駆体であるエチレングリコール 0.5%、0.75%、1.0%の濃度で自由飲水させた EG 群、それぞれのエチレングリコール濃度に HFCS を一般的な清涼飲料水と同程度の濃度である 10%を溶解し自由飲水させた EH 群の 2 群を 8 週間飼育し 20 週齢で屠殺した。原子吸光法による腎組織内 Ca 測定と組織内 Ca 沈着 (H&E) の評価を行った。

#### (2) ラットを用いた HFCS が腎臓に及ぼす影響の検討

##### 動物実験

11週齢の wister rat (n=20)を飼育環境 (day: night=12hr:12hr 24度の一定環境下) に1週間順化の後、Control 群と HFCS 群を体重が均等となるように、各群 10 頭ずつの 2 群に分け 1 ケージ 1 頭で飼育した。飼料は一般的な飼料を自由摂取とし、飲水は一般的な硬度の市販の硬水を使用し自由飲水とした。HFCS 群には同水に 137g/L HFCS 55 を一般的な清涼飲料水と同程度の濃度である 10% を溶解した。飲水量を毎日測定し、体重は週 1 回測定を行った。8 週間飼育し 20 週齢で屠殺した。

屠殺前にメタボリックケージを利用し 24 時間蓄尿を行った。蓄尿時は絶食、自由飲水とした。イソフルランによる全身麻酔の後、腹部を正中切開し下大静脈より採血を行い、腎臓、肝臓を採取した。採取した組織を適度な大きさに分割の後、一部を 10%ホルマリン固定、一部を液体窒素にて急速凍結を行った。

血液検査では BUN、クレアチニン、尿酸、LDL-C、中性脂肪、グルコース、HbA1c を測定した。尿検査は尿量、pH、カルシウム、クレアチニン、尿酸、8-OhdG、シュウ酸、クエン酸の測定を行った。組織染色は 10%ホルマリンにて固定した腎臓を短軸方向で切除しパラフィン包埋を行った後に 3 $\mu$ m の組織切片を作成。また同様にホルマリン固定した肝臓も同様に組織切片を作成。ヘマトキシリン-エオシン染色施行し組織評価を行った。

##### 血清 TAGE・腎臓、肝臓組織中 TAGE の測定

###### ・血清中の TAGE の測定

血清中のグリセルアルデヒド由来の AGEs (toxic AGEs, TAGE) は、免疫精製した TAGE 抗体を用いた競合的酵素結合免疫吸着法 (ELISA) で測定。

###### ・腎臓・肝臓における TAGE 濃度の測定

スロットブロット (Slot blot: SB) 解析: サンプルは、凍結した組織を液体窒素下で粉碎し、緩衝液で溶解してホモジナイズした。遠心分離を行い、上澄みを細胞抽出液として回収。タンパク質濃度を測定した。TAGE の検出では、SB 装置で固定したポリビニリデンジフルオライド (PVDF)

膜 (0.45 μm) に、細胞抽出液、HRP 結合分子マーカー、TAGE-BSA を等量ずつロードし PVDF 膜を切断して 2 枚の膜を用意し、0.05% Tween 20 を含む PBS (SM-PBS-T) 中の 5% 脱脂乳を用いて、ブロッキング後、膜を抗 TAGE-抗体 (1:1,000) または中和した抗 TAGE-抗体 (抗 TAGE-抗体 (1:1,000) と 250 μg/ml の TAGE-BSA の混合物) と 4 で一晩インキュベート。その後、メンブレン上のタンパク質を、HRP 結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:2,000) とインキュベートし膜上のバンド密度を測定した。

#### 腎臓でのリアルタイム PCR による RAGE 遺伝子発現の検討

##### ・RNA 抽出

サンプルとして実験②-1 にて得た凍結した腎臓を検体とし RNA 抽出を行った。抽出した RNA は濃度と A260/280 を測定した。

##### ・リアルタイム PCR

抽出した RNA を用いてリアルタイム PCR を TaqMan® Gene Expression Assay で実施した。各サンプルの結果は -actin (Rn00667869\_m1) との相対比で示した。

#### DNA マイクロアレイ解析とリアルタイム PCR

##### ・DNA マイクロアレイ

前述の方法で抽出した RNA を用いて Control 群 (n=3) と HFCS 群 (n=3) を各 3 頭選抜し、DNA マイクロアレイを施行した。1.5-fold change の変動を認めた遺伝子を解析し、そのうち Control 群に比べて HFCS 群で RNA 発現量に統計学的有意差を認めた遺伝子を特定した。統計は t 検定を用い p<0.05 を満たしたものを統計学的に有意差があると評価した。

また得られた DNA マイクロアレイのデータから Ingenuity Pathway Analysis を用いて分子間ネットワーク/パスウェイ解析を行った。

#### 血清 TAGE、肝組織中 TAGE と遺伝子変動の相関

血清 TAGE、肝組織内 TAGE と HFCS 負荷によって変動を認めた腎組織中の遺伝子のうち、リアルタイム PCR を施行した 4 遺伝子との相関関係を Pearson の積算相関係数を用いて評価した。血清 TAGE と肝組織内 TAGE は実測値を用い、4 遺伝子に関してはリアルタイム PCR による遺伝子発現量を用いた。相関係数を 0.07 以下かつ、p 値<0.05 以下を満たしたものを有意な相関関係があると評価した。

#### 統計解析

2 群間の平均値の比較に関して、Mann-Whitney U 検定ないしは t 検定を用いた。p 値<0.05 以下を満たしたものを有意な相関関係があると評価した。また相関関係の検定に関しては Pearson の積算相関係数を用いて評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 結石形成モデルラットの作成

エチレングリコールのみを投与した EG 群ではいづれのエチレングリコール濃度 (0.5%, 0.75%, 1.0%) においても、腎臓にシュウ酸カルシウム結晶の沈着を認めなかった。しかしながら、エチレングリコールに 10%HFCS を付加した群ではエチレングリコール濃度によらず腎臓にシュウ酸カルシウム結晶の沈着を認めた。EG 群と EH 群の比較においてエチレングリコール摂取量によらず HFCS を負荷することでシュウ酸カルシウム結晶の沈着を認めたことから、HFCS が腎臓に及ぼす影響の検討を実験 で検討した。

### (2) ラットを用いた HFCS が腎臓に及ぼす影響の検討

#### 動物実験

結果：8 週間飼育の後、体重は 2 群間で差を認めなかった。飲水量と尿量は Control 群に比べ HFCS 群において有意に多く、これは飲水量を反映したものと考えられた。(Fig1) 組織像の評価のため、ヘマトキシリン-エオシン染色にて肝臓と腎臓組織の観察をおこなった。Control 群と HFCS 群の間に形態学的に異なる点は認められなかった。

尿検査では Control 群に比べ HFCS 群でマグネシウムの排泄量の上昇を認めた。クレアチン、尿酸、カルシウム、シュウ酸、クエン酸、8-OHdG に関しては 2 群間で統計学的に有意差を認めなかった。

血液検査では Control 群に比べ HFCS 群において BUN、中性脂肪、HbA1c の有意な上昇を認めた。クレアチニン、尿酸、LDL-C、血糖値に関しては 2 群間で差を認めなかった。

以上のことから、ラットに HFCS を負荷することで高脂血症を呈することが明らかとなった。

#### 血清 TAGE・腎臓、肝臓組織中 TAGE の測定

HFCS 負荷による体内 TAGE の増加を検討するため、実験②-1 で得た血清、腎臓、肝臓における TAGE 測定を行った。それぞれのサンプルは Control 群、HFCS 群 (血清; 各群 n=10、計 n=20、肝臓・腎臓; 各群 n=10、計 n=20) を用い、血清 TAGE は ELISA 法、腎臓、肝臓においてはスロットプロット法にて測定した。

血清 TAGE は Control 群に比べ HFCS 群において有意な上昇を認めた。組織内 TAGE に関して、腎組織内 TAGE はいずれの群においても測定感度以下であった。肝組織中 TAGE は Control 群に比べ HFCS 群において有意な上昇を認めた。HFCS を負荷することで肝臓組織中 TAGE が蓄積することは過去の報告を支持する結果となった。

#### 腎臓でのリアルタイム PCR による RAGE 遺伝子発現の検討

リアルタイム PCR にて Control 群と HFCS 群の腎臓における RAGE 遺伝子発現の検討を行った。結果、両群とも RAGE 遺伝子発現を認めたが、両群間において統計学的に有意な差を認めなかった。

#### DNA マイクロアレイ解析とリアルタイム PCR

Fold change>1.5 以上の変動を認め、Control 群に比べ統計学的に有意な遺伝子変動が 28 遺伝子あり、そのうち、命名されている遺伝子を 13 遺伝子認めた。8 遺伝子の up regulate、5 遺伝子の down regulate を認め、HFCS 負荷によって up regulate された遺伝子は Hbb, Hba1/Hba2, CYP24A1, BCL6, PLIN2, WSB1, MLPH, FERMT1 であり、down regulate された遺伝子は FKBP5, CALB1, SCNN1A, C9orf3, USP2 であった。またこれらの遺伝子を IPA を用いて分子間ネットワーク/パスウェイ解析を行った。フルクトース代謝と関連のある遺伝子変動として Hba1/Hba2, WSB1, MLPH はこれまでに報告のない遺伝子であった。

DNA マイクロアレイ結果、生活習慣病に関与しうる可能性のある 4 遺伝子 (CYP24A1, PLIN2, CALB1, USP2) に着目し、リアルタイム PCR による validation を行った。サンプルは実験 で得た腎組織を用いて Control 群 (n=10)、HFCS 群 (n=10) で施行した。

その結果、CYP24A1 に関しては、統計学的に有意差は認めなかったものの、PLIN2, Calb1, USP2 に関しては統計学的に有意差をもって変動を認め DNA マイクロアレイ測定の結果がリアルタイム PCR についても確認された。

#### 血清 TAGE、肝組織中 TAGE と遺伝子変動の相関

TAGE が腎臓における遺伝子発現を誘導するという仮説のもとに、リアルタイム PCR を施行した 4 遺伝子について、血清 TAGE と肝臓組織内 TAGE の相関を検討した。Pearson の積算相関係数を用い、 $p < 0.05$  を満たしたものの統計学的に有意と評価した。

血清 TAGE は腎臓における PLIN2、Cyp24A1、Usp2、Calb1 の遺伝子発現と統計学的に有意な相関関係を認めなかった。肝組織内 TAGE に関して、USP2 と Calb1 遺伝子発現と肝組織内 TAGE は負の相関を認め統計学的な有意差を認めた。血清 TAGE と腎臓における遺伝子発現と有意な相関関係を認めなかったものの、肝組織内 TAGE と USP2 と Calb1 の遺伝子発現には統計学的有意な負の相関関係を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 井上慎也、國井建司郎、牛本千春子、中澤佑介、中村有香、高田尊信、石垣靖人、竹内正義、宮澤克人	4. 巻 18
2. 論文標題 HFCS(High Fructose Corn Syrup)が尿路結石形成に及ぼす機序の解明	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本尿路結石症学会誌	6. 最初と最後の頁 129-131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 井上慎也、國井建司郎、牛本千春子、中澤佑介、中村有香、高田尊信、石垣靖人、竹内正義、宮澤克人	4. 巻 18
2. 論文標題 結石研究における継承と創生 学内の輪 総合医学研究所との共同研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本尿路結石症学会誌	6. 最初と最後の頁 13-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 井上慎也、國井建司郎、牛本千春子、中澤佑介、高田尊信、石垣靖人、竹内正義、宮澤克人	4. 巻 17
2. 論文標題 尿路結石研究 わたくしがたどった道 大学院生の立場から	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本尿路結石症学会誌	6. 最初と最後の頁 32-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Shinya, Takata Takanobu, Nakazawa Yusuke, Nakamura Yuka, Guo Xin, Yamada Sohsoke, Ishigaki Yasuhito, Takeuchi Masayoshi, Miyazawa Katsuhito	4. 巻 13
2. 論文標題 Potential of an Interorgan Network Mediated by Toxic Advanced Glycation End-Products in a Rat Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 80~80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu13010080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上慎也、國井建司郎、牛本千春子、中澤佑介、中村有香、高田尊信、石垣靖人、竹内正義、宮澤克人
2. 発表標題 HFCS(High Fructose Corn Syrup)が尿路結石形成に及ぼす機序の解明
3. 学会等名 日本尿路結石症学会第29回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上慎也、國井建司郎、牛本千春子、中澤佑介、中村有香、高田尊信、石垣靖人、竹内正義、宮澤克人
2. 発表標題 結石研究における継承と創生 学内の輪 総合医学研究所との共同研究
3. 学会等名 日本尿路結石症学会第29回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上慎也、國井建司郎、牛本千春子、中澤佑介、高田尊信、石垣靖人、竹内正義、宮澤克人
2. 発表標題 シンポジウム2 尿路結石症研究 わたくしがたどった道 S-1 大学院生の立場から
3. 学会等名 日本尿路結石症学会第28回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上慎也、國井建司郎、牛本千春子、中澤佑介、中村有香、高田尊信、石垣靖人、竹内正義、宮澤克人
2. 発表標題 HFCS(High Fructose Corn Syrup)が尿路結石形成に及ぼす機序の解明
3. 学会等名 第23回北陸泌尿器科Basic Research Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上慎也、國井建司郎、牛本千春子、中澤佑介、中村有香、高田尊信、石垣靖人、竹内正義、宮澤克人
2. 発表標題 HFCS(High Fructose Corn Syrup)が腎臓に与える遺伝子変動とToxic AGEsを介した臓器間ネットワークの解明
3. 学会等名 第70回日本泌尿器科学会中部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上慎也、國井建司郎、牛本千春子、中澤佑介、中村有香、高田尊信、石垣靖人、竹内正義、宮澤克人
2. 発表標題 HFCS(High Fructose Corn Syrup)によって誘導される遺伝子発現とToxic AGEsを介した臓器間ネットワークの解明
3. 学会等名 第29回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上慎也、國井建司郎、牛本千春子、中澤佑介、宮澤克人
2. 発表標題 食塩・糖質の過剰摂取が尿路結石症発症に関与する遺伝子発現を誘導する
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------