

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791481

研究課題名（和文） メタボリックシンドローム下の尿路結石形成機序の解明とアディポサイトカイン機能解析

研究課題名（英文） The mechanism of urolithiasis formation and the analysis of adipocytokine under metabolic syndrome

研究代表者

藤井 泰普 (FUJII YASUHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：30566229

研究成果の概要（和文）：本研究から、ob/ob マウスにおいてアディポネクチン産生低下と炎症の亢進、酸化ストレスの増加が尿路結石形成の促進に関与していると考えられた。この結果は、アディポネクチンが炎症と酸化ストレス因子を抑え新しい結石予防薬への応用に発展しうると考えられた。また、共培養において、腎尿路上皮細胞と脂肪細胞は特徴的な変化を認めた。この変化は MetS 環境下での両細胞におけるパラクラインシステムによる可能性が示唆された。その結果、これらの結石-動脈硬化関連遺伝子の発現変化からは MetS が結石形成促進すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, Kidney crystal formation in the MetS environment increased OPN and MCP-1 expression, and decreased SOD expression in renal tissue. Collectively, APN is possible to prevent kidney stone by regulating inflammation and oxidative stress at the biomolecular level. Next, the renal tubular epithelial cells and adipocytes showed characteristic expression patterns of kidney stone-related genes in the coculture. These phenomena might be due to MetS environment-induced paracrine system between renal tubular epithelial cells and adipocytes, and suggests that MetS environment may lead to kidney stone formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：メタボリックシンドローム、炎症、オステオポンチン、アディポネクチン、酸化ストレス、尿路結石

1. 研究開始当初の背景

本邦では、心血管疾患予防の観点から提唱されたメタボリックシンドローム (MetS) という概念が広く浸透・定着してきた。MetS は、心血管疾患以外の疾患においても、成因に関わっていると考えられる。一方、本邦における尿路結石症の生涯罹患率は 10 人に 1 人に達し、この 40 年で発生頻度は約 3 倍に増加した。その原因として高度経済成長に伴う食生活、ライフスタイルの変化、特に脂質、動物性タンパク質摂取量の増加が考えられている。私たちは以下の報告を行ってきた。

- (1) 尿路結石にわずかに含まれる有機物質としてオステオポンチン (OPN) を同定し、尿路結石モデルラット腎で発現が増強すること、動脈硬化発生時にも発現することを明らかにした。疫学的にも尿路結石と動脈硬化の類似性が多いことを示した。
- (2) マウスに蔞酸前駆物質であるグリオキシル酸 (以下 GOX) を腹腔内投与することにより結石モデルマウスを確立し、OPN のノックアウトマウスでは結石が形成されなくなることを明らかにした。
- (3) 尿路結石にわずかに含まれる有機物質としてオステオポンチン (OPN) を同定し、尿路結石モデルラット腎で発現が増強すること、動脈硬化発生時にも発現することを明らかにした。疫学的にも尿路結石と動脈硬化の類似性が多いことを示した。

欧米における疫学的研究では、尿路結石との強い関連性が示唆され、MetS 関連疾患である高血圧、糖尿病患者では尿路結石の有病率が健常者と比較して高率であると報告されている。また、我が国の国民栄養調査から得られた肥満および中性脂肪・コレステロールの性差別年齢分布は、尿路結石の罹患率と高い相関を示している。以上のことから、メタボリックシンドロームが尿路結石の要因となると推測され、本研究では、その関連とメカニズムを明らかにする。また、その際のアディポサイトカインの発現および変化を、In vivo と In vitro の両方で明らかにする必要

があると考えられる。

2. 研究の目的

尿路結石は、動脈硬化と発生機序が類似しており、肥満、糖尿病との合併が多く、メタボリックシンドローム (MetS) の関連疾患と考えられる。本研究の目的は、MetS モデルマウスを用いた尿路結石形成機序の解明と、脂肪細胞と腎尿細管細胞の共培養による相互作用の解明によって、メタボリック環境の尿路結石形成への影響を明らかにし、予防法を提唱することである。

3. 研究の方法

(1) Mets モデルマウスを用いた研究

ob/ob マウス (B6. V-Lep^{ob}/J) はレプチンの欠損により、4 週齢頃から肥満、過食、高血糖、耐糖能低下、高インスリン血症、代謝低下等が認められ、MetS モデルマウスとして使用される。シュウ酸前駆物質を投与した際の尿路結石形成、消失およびその形態を確認し、MetS において結石形成を促進するか否か、また、その結石形態の特徴を検討する。主として脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカイン (アディポネクチン、MCP-1、PAI-1 等) は腎組織でも発現している。そのため、摘出腎におけるアディポサイトカインや酸化ストレス (SOD, MDA, 8-OHdG) の発現の経日的変化を定量する。24 時間尿中生化学物質の排泄量も測定し、結石形成への影響を詳細に検討する。

(2) 培養細胞を用いた研究

M-1) と脂肪細胞 (3T3-L1) をそれぞれ、および共培養し、尿路結石形成の初期過程である腎尿細管細胞とシュウ酸カルシウム 1 水和物 (COM) 結晶の接着能を評価する。非接触共培養によって主として脂肪細胞から産生されるアディポサイトカインのパラクライン調節の影響を評価し、MetS と結石形成の関連を明らかにする。

4. 研究成果

(1) MetS モデルマウス (B6. V-Lepob) の繁殖とグリオキシル酸 (GOX) 投与による結石形成機序の解明-In vivo-

8 週齢の wild type, ob/ob の各 3 匹に対し、グリオキシル酸 (GOX) (A) 25, 50mg/kg (B) 1.5mg, 3mg/body を連日腹腔内投与した。50mg/kg 投与と 3mg 投与では結石形成の有意差は認められず、総投与量または体重あたり投与量の両者では差がないことが判った。各 6 匹に、GOX50mg/kg を連日腹腔内投与して結石形成マウスを作成し、投与 6 日目に腎組織内の結晶形成量、血液・尿生化学を評価した。ob/ob は有意に結石増加を認めた ($p < 0.01$)。血液生化学検査では、ob/ob において TG, T-chl は有意に高値であった ($p < 0.05$) が UA, Ca, P, Mg は有意差を認めなかった。尿生化学検査では両群間に有意差を認めなかった。OPN, SOD, MCP-1, F4/80, Adiponectin の腎組織発現を免疫染色、western blotting、定量 PCR で評価した。OPN, MCP-1, F4/80 は、結石形成に伴い発現の増加がみられた。SOD, アディポネクチンは ob/ob マウスにおいて発現の減少を認めた。MetS では結石形成が促進され、無機物質の代謝以外の経路が存在する可能性が示唆され、MetS による炎症の亢進、酸化ストレス増加が結石形成を促進する一因と考えられた。アディポネクチンの低下が結石形成に関与する可能性が示唆された。

(2) 脂肪細胞存在下におけるマウス尿管上皮細胞 (M-1) とシュウ酸カルシウム水和物 (COM 結晶) の接着能の検討 (脂肪細胞のパラクリン機能の評価)-In Vitro-

M-1 および 3T3-L1 培養細胞の安定した継代、cell line を確立し、共培養 (接触型、非接触型) の条件を確立した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Fujii Y, Okada A, Yasui T, Niimi K, Hamamoto S, Hirose M, Kubota Y, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. : Effect of Adiponectin on Kidney Crystal

Formation in Metabolic Syndrome Model Mice via Inhibition of Inflammation and Apoptosis. PLoS One, 査読あり, Vol.8, No.4, 2013, e61343.

DOI : 10.1371/journal.pone.0061343.

[学会発表] (計 11 件)

- ① Fujii Yasuhiro, Okada Atsushi, Kobayashi Takahiro, Usami Masayuki, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahiro, Yasui Takahiro, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Adiponectin ameliorates kidney stone formation in metabolic syndrome model mice. 第 32 回国際泌尿器科学会 (SIU)、2012.9.30-10.4、福岡市
- ② Fujii Yasuhiro, Okada Atsushi, Ichikawa Jun, Taguchi Kazumi, Hirose Yasuhiko, Hamamoto Shuzo, Yasui Takahiro, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Elucidation of metabolic syndrome-related paracrine system by co-culturing renal tubular epithelial cells and adipocytes. 第 32 回国際泌尿器科学会 (SIU)、2012.9.30-10.4、福岡市
- ③ 藤井 泰普、岡田 淳志、安井 孝周、廣瀬 泰彦、濱本 周造、安藤 亮介、広瀬 真仁、伊藤 恭典、戸澤 啓一、郡 健二郎: メタボリックシンドロームモデルマウスにおける腎結石関連遺伝子の同定と機能解析。第 55 回日本腎臓学会学術総会、2012.6.1-3、横浜市
- ④ Fujii Yasuhiro, Okada Atsushi, Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Itoh Yasunori, Yasui Takahiro, Kojima Yoshiyuki, Tozawa Keiichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: The role of long-term loading of cholesterol in renal crystal formation. American Urological Association Annual Meeting 2012, 2012.5.19-24, Atlanta (USA)
- ⑤ Fujii Yasuhiro, Okada Atsushi, Ichikawa Jun, Niimi Kazuhiro, Kobayashi Takahiro, Hamamoto Shuzo,

Hirose Masahito, Itoh Yasunori, Yasui Takahiro, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Adiponectin is a possible inhibitor for metabolic syndrome induced kidney stone formation using ob/ob mouse. 1st Meeting of the EAU Section of Urolithiasis (EULIS), 2011.9.7-10, London(United Kingdom)

- ⑥ 藤井 泰普、岡田 淳志、市川 潤、田口 和己、新美 和寛、小林 隆宏、廣瀬 泰彦、濱本 周造、広瀬 真仁、安井 孝周、伊藤 恭典、戸澤 啓一、郡 健二郎：メタボリックシンドロームにおける腎結石形成の促進とアディポネクチンによる結石予防効果。第20回日本腎泌尿器疾患予防医学研究会、2011.7.7-8、前橋市
- ⑦ 藤井 泰普、岡田 淳志、新美 和寛、小林 隆宏、濱本 周造、伊藤 恭典、安井 孝周、戸澤 啓一、郡 健二郎：肥満モデルマウスによる尿路結石の形成機序の解明とアディポネクチンによる結石抑制効果の検討。第54回日本腎臓学会学術総会、2011.6.15-17、横浜市
- ⑧ 岡田 淳志、藤井 泰普：メタボリックシンドロームにおける腎結石形成機序の解明と再発予防法の開発。平成22年度愛知腎臓財団助成研究発表会、2011.6.4、名古屋市
- ⑨ 藤井 泰普、岡田 淳志、安積 秀和、濱本 周造、梅本 幸裕、安井 孝周、河合 憲康、戸澤 啓一、郡 健二郎：メタボリックシンドロームモデルマウスにおける尿路結石形成の促進とアディポネクチン投与による尿路結石抑制効果。第99回日本泌尿器科学会総会、2011.4.21-24、名古屋市
- ⑩ 藤井 泰普、岡田 淳志、市川 潤、中岡 和徳、田口 和己、新美 和寛、小林 隆宏、廣瀬 泰彦、濱本 周造、広瀬 真仁、安井 孝周、伊藤 恭典、戸澤 啓一、郡 健二郎：メタボリックシンドロームモデルマウスにおける結石形成の促進とアディポネクチン投与による結石抑制効果。日本尿路結石症学会第20回学術集会、2010.8.27-28、大阪市

- ⑪ 藤井 泰普、岡田 淳志、市川 潤、中岡 和徳、田口 和己、新美 和寛、小林 隆宏、廣瀬 泰彦、濱本 周造、安井 孝周、伊藤 恭典、戸澤 啓一、郡 健二郎：メタボリックシンドローム (MetS)モデルマウスにおける尿路結石形成の促進とアディポネクチン投与による結石形成抑制効果。高尿酸血症・メタボリックシンドロームリサーチフォーラム第6回研究集会。2010.7.31、大阪市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 泰普 (FUJII YASUHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：30566229