

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791661

研究課題名(和文)腎結石とメタボリックシンドロームに係わる遺伝子の同定と再発予防への応用

研究課題名(英文)Effect of Adiponectin on Kidney Crystal Formation in Metabolic Syndrome Model Mice via Inhibition of Inflammation and Apoptosis

研究代表者

矢内 良昌 (Yanai, Yoshimasa)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：40468252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：投与0および6日目のwild type群、投与0日目のob/ob群では腎結石形成はみられなかった。投与6日目のob/ob群では皮髄境界部を中心に腎結石が多発してみられた。一方、ob/ob+APN群では腎結石形成の有意な減少を認めた。次いで、APNによる腎結石形成の抑制関連遺伝子として154の遺伝子が発現低下し、190の遺伝子が発現増加していた。これらの遺伝子の中で、特に発現の増減が著しかったのは、Aurka (AURKA)とTk1 (TK1)の増加とCcl2 (MCP-1)とStat3 (STAT3)の低下であった。さらに、これらのGO解析では、抗炎症作用と抗アポトーシス作用を示した。

研究成果の概要(英文)： Wild-type (+/+) mice showed no kidney crystal formation, whereas ob/ob mice showed crystal depositions in their renal tubules. Expression analysis of genes associated with MetS-related kidney crystal formation identified 259 genes that were >2.0-fold up-regulated and 243 genes that were <0.5-fold down-regulated. Gene Ontology (GO) analyses revealed that the up-regulated genes belonged to the categories of immunoreaction, inflammation, and adhesion molecules and that the down-regulated genes belonged to the categories of oxidative stress and lipid metabolism. Expression analysis of adiponectin-induced genes related to crystal prevention revealed that the numbers of up- and down-regulated genes were 154 and 190, respectively. GO analyses indicated that the up-regulated genes belonged to the categories of cellular and mitochondrial repair, whereas the down-regulated genes belonged to the categories of immune and inflammatory reactions and apoptosis.

研究分野：腎・泌尿器科学分野

キーワード：メタボリックシンドローム 腎結石 アディポネクチン

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) マウスに蓚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

【研究 1: APN による結石抑制効果の検討】

ob/ob マウスに対し、50mg/kgGOX 腹腔内投与群 (6 匹) と 50mg/kgGOX 腹腔内投与 + 2.5 μg/ml, 0.2mlAPN 皮下投与群にわけ検討する。投与 0 日目と投与 5 日目に 24 時間蓄尿を行い、シュウ酸、クエン酸、カルシウム、リン、マグネシウムなどの結石関連物質の尿中排泄量を測定する。また、投与 6 日目に sacrifice し、血清、腎を採取する。血清から結石関連物質 (カルシウム、リン、マグネシウム、クレアチニン) や脂質関連物質 (遊離脂肪酸、総コレステロール、中性脂肪、アディポネクチン) を測定する。摘出腎からは Pizzolato 染色と偏光顕微鏡により、結石形成の確認と画像解析ソフトである Image pro plus をもちいて結石形成量を定量化する。また、摘出腎における結石関連遺伝子 (OPN、MCP-1 等)、酸化ストレス (SOD, 8-OHdG)、APN の発現変化を定量 PCR、免疫染色、Western blotting にて検討する。

【研究 2: マイクロアレイ解析による結石形成機序と APN による結石抑制機序の解明】

研究 1 の方法に準じ、Wild-type および ob/ob 各 6 匹に対し、50mg/kgGOX 腹腔内投与を施行し、投与 0、6 日目の腎組織を摘出する。摘出腎から totalRNA を抽出し、マイクロアレイ解析を施行する。解析方法として、まず、以下 (-) の群間における 2.0 以

上、0.5 以下の発現を示す遺伝子群を同定する。(GOX 投与による影響 MetS による影響 GOX と結石形成による影響 MetS と結石形成による影響 GOX と MetS と結石形成による影響 APN による影響)。さらに、より選択された結石関連遺伝子群の同定を行うために Venn diagram (ベン図) をもちいて検討する。結石関連遺伝子群は で同定された遺伝子群から で同定された遺伝子群を除いたもの(-)、遺伝子群から の遺伝子群を除いたもの(-)、 の遺伝子群から と の遺伝子群をのぞいたもの(- -)の 3 つに共通して 2.0 以上、0.5 以下の発現を示す遺伝子群と定義し Venn diagram を用いて検討を行う。さらに同定された結石関連遺伝子における Gene ontology 解析を行い biological process、cellular component、molecular function の 3 つのカテゴリーからなる生物学的概念を決定する。ついで、APN 投与による影響()における 2.0 以上、0.5 以下の発現を示す遺伝子群を同定する。先ほど得られた結石関連遺伝子のうち 2.0 以上示した遺伝子群と APN 投与により 0.5 以下の発現を示した遺伝子群の共通遺伝子、結石関連遺伝子のうち 0.5 以上示した遺伝子群と APN 投与により 0.5 以下の発現を示した遺伝子群の共通遺伝子を APN による結石抑制に関与する遺伝子と定義して同様に検討を行う。同様に Gene ontology 解析を施行する。

4 . 研究成果

【研究 1 : APN による結石抑制効果の検討】

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 を連日腹腔内投与をおこなった。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。

【研究 2: マイクロアレイ解析による結石形成機序と APN による結石抑制機序の解明】

MetS による腎結石形成の促進関連遺伝子として 243 の遺伝子が発現低下し、259 の遺伝子が発現増加していた。これらの遺伝子の中で、特に発現の変化が著しかったのは、*Cd44* (CD44)、*Lysozyme 1*; *Lyz1* (LYZ1) と *Vcam1* (VCAM1) の増加 (Fold change : 13.15, 15.48, 17.64) と *Solute carrier family 12, member 1*; *Slc12a1* (SLC12A1) と *Solute carrier family 7, member 13*; *Slc7a13* (SLC7A13) の低下 (Fold change : 0.174, 0.220) であった。さらに、これらの GO 解析では、細胞接着、炎症、免疫応答の亢進とミトコンドリア機能の低下を示した。APN による腎結石形成の抑制関連遺伝子として 154 の遺伝子が発現低下し、190 の遺伝子が発現増加していた。これらの遺伝子の中で、特に発現の変化が著しかったのは、*Aurora kinase A*; *Aurka* (AURKA) および *Thymidine kinase 1*; *Tk1* (TK1) の増加 (Fold change : 3.065, 2.823) であった。さらに、これらの GO 解析では、抗炎症作用と抗アポトーシス作用を示した。

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)

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 5 件)

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、福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

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、福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

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、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

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)

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：ゲノムワイド解析によるメタボリックシンドローム環境下の腎結石関連遺伝子の同定と機能解析。第 100 回日本泌尿器科学会総会、2012.4.21-24、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

矢内 良昌 (YANAI YOSHIMASA)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：40468252

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4) 研究協力者

藤井 泰普 (FUJUI 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