

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670702

研究課題名(和文)石灰化をともなう生活習慣病の病態解明と診断・治療法への応用

研究課題名(英文) Pathophysiology of life-related diseases with ectopic calcification: approaches for diagnostics and therapy

研究代表者

公文 裕巳 (Kumon, Hiromi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・特命教授

研究者番号：30144760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、線照射FBS中の成分、特に酸化脂質が尿路結石由来の石灰化小球、いわゆる“ナノバクテリア様粒子(NLP)”形成の足場となり、その形成を促進しうることを明らかにした。異なる培養条件下でのNLP由来の脂質成分を用いたTLC、および、質量解析により、線照射FBSで増殖したNLPにはLyso-PCが検出された。また、線照射FBSそのもの、および、非照射FBSにoxLig-1リポソームを添加して増殖させたNLPでは大量の7-ケトコレステロールとoxLig-1が検出された。走査電子顕微鏡観察では、線照射FBSを添加したNLPがより大きく成長し、丸みを帯びることが示された。

研究成果の概要(英文)：Our study has revealed the components, especially, oxidized lipids derived from -irradiated FBS can act as a scaffold to generate so-called “Nanobacteria-like particles (NLP)”. Lipids were extracted from three different experimental groups and were subjected to be separated on TLC plate. Individual spot was collected and further analyzed with MALDI-TOF-MS, while the oxidized lipids were characterized with MS/MS. As a result, lyso-PC was detected in NLP grown in -irradiated FBS. Nevertheless, 7-ketocholesterol and oxLig-1 (7-ketocholesteryl 9-carboxynonanoate) were found abundantly in both -irradiated FBS itself and NLP grown with non- -irradiated FBS in the presence of oxLig-1-liposomes. Subsequent characterization of those NLP specimens by scanning electron microscopy revealed that NLPs grown in -irradiated FBS demonstrated rounded shapes with larger dimensions than those in non- -irradiated FBS.

研究分野：泌尿器科学、ナノバイオテクノロジー、遺伝子治療学

キーワード：石灰化小球 酸化脂質 質量分析 イメージング質量分析 異所性石灰化

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、尿路結石などの異所性石灰化の原因微生物として報告された謎の“ナノバクテリア”が、生命体ではなく、特殊な酸化脂質を足場として形成されるアパタイト粒子そのものであることを世界に先駆けて解明した。尿路結石由来のナノバクテリア様粒子 (NLP) を用いて自己増殖のメカニズムと動脈硬化をはじめとする慢性炎症性疾患における異所性石灰化に関与する新規病態メカニズムを提唱して、Nanomedicine (Impact factor 6.93) に報告した。

異所性石灰化とは、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、ヒドロキシアパタイト (HAP) などの無機結晶が骨以外の軟部組織に沈着した状態であり、尿路結石はもとより動脈 (中膜) の石灰化もその一つである。in vitro の実験系で、NLP の成長過程を電顕で解析し、規則正しく整列したラメラ (膜様) 構造が出現、このラメラ構造を足場として NLP (アパタイトの結晶) が成長することを見いだした。申請者らが以前に樹立した NLP に特異的な IgM モノクローナル抗体 (脂質の polar head や acyl 基 (ω 位) に存在するカルボキシル基、あるいは、遊離のリン酸基を認識) と金コロイドを用いた免疫電顕で、ラメラ構造はカルシウムをキレートする酸化脂質で構成されていることが明らかとなった。これらの成績にもとづいて、「異所性石灰化としてのアパタイト形成は、生体内での脂質過酸化により生じる酸化脂質を足場とするバイオミネラリゼーション (mineralo-oxidized complexes) である」と結論した。

2. 研究の目的

本研究では病態を構築する共通基盤を詳細に解明するため、①NLP より抽出した脂質の質量分析 (MS) 解析を行い、異所性石灰化に関わる酸性脂質を同定するとともに、②

培養系での酸化脂質の NLP (アパタイト結晶) 形成における役割、および、③生体内の異所性石灰化における脂質過酸化の関与について検討を加えた。

3. 研究の方法

(1) HAP からの NLP 作製試験

市販の HAP を乳鉢と乳棒で細かく粉砕し、DMEM 培地に 10% (w/v) となるように加えて超音波処理を行い、遠心上清を 0.2 μ m のフィルターでろ過したものを NLP 形成のための核として用いた。これを 2 つに分けて一方に γ 線照射 FBS を 10%、他方に非照射 FBS を 10% 添加した。これらを小培養フラスコに分注し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下でインキュベーションを行った。約 2 週間ごとにフラスコ各 1 本から回収し、650nm の吸光度を測定した。

(1) - (2) の全ての実験は細菌、真菌の汚染の無いことを確認した。

(2) NLP の大量培養と酸化脂質添加による増殖比較

尿路結石由来の NLP を、 γ 線照射牛胎児血清 (FBS) を 10% 含有する DMEM 培地 (Gibco, CaCl₂ 200mM 含有) に懸濁し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下でインキュベーションを行い、定期的の一部を継代し、残りを遠心により集め、トリスバッファーで洗浄して脂質解析に用いるまで冷凍保存して蓄積した。対照として、同じ由来の NLP を γ 線非照射 FBS で同様にインキュベーションし、継代および保存を行った。

また、酸化脂質の例として oxLig-1 (7-Ketocholesteryl-9-carboxynonanoate) を含むリポソームを調製し、 γ 線非照射 FBS 入り培地で継代してきた NLP の培地に 5% となるよう添加し、小培養フラスコに分注し、 γ 線非照射 FBS 存在下で培養し、2 週間ごとに 8 週間までの検体を回収し、650nm の吸光度を測定した。対照として酸化脂質を含

まないリポソームを添加して同様の操作を行った。

(3) NLP からの脂質抽出と MS 解析

冷凍保存した NLP を解凍し、遠心して沈殿を集め、0.01M 塩酸を添加したのち、クロロホルム/メタノールを加えて攪拌し、脂質を抽出、回収し、溶媒を濃縮、乾燥後、秤量した。抽出された脂質をそのまま、あるいは TLC により分離して、MALDI-TOF-MS にて質量分析を行った。マトリックスとして用いた 5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) はメタノール/1%TFA/Milli-Q (5 : 1 : 4) 混合液で溶解したものを遠心し、その上清を使用した。

(4) 電子顕微鏡による NLP の観察

(2) で培養した NLP (γ 線照射、あるいは非照射 FBS 添加) をそれぞれプラスチックディスクに載せて乾燥し、走査型電子顕微鏡にて観察した。

(5) 臨床検体および疾患モデルマウスの組織染色

臨床病巣における異所性石灰化病巣の局在および病理学的変化を観察するために、腎がん、尿管がん、膀胱がんおよび腎盂がん患者の腎乳頭および腎動脈、腸骨動静脈の組織切片を作り、組織染色および石灰化特異抗体による免疫染色を行った。厚さ 2.5 μ m の凍結組織切片を作製し、4%のバラホルムアルデヒドに 10 分間固定後、染色に用いた。

1) Von Kossa 染色

組織切片は、硝酸銀水溶液に 1 時間反応させ、Nuclear Fast Red (核染色) で 10 分間対比染色を行った。アルコール系列とキシレンにより脱水し、マリノールで封入した。カルシウムの沈着は光学顕微鏡法により観察した。

2) 免疫染色

組織切片を Cy5.5 で標識した NLP に対す

る特異抗体と 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させ、免疫蛍光顕微鏡により観察した。

4. 研究成果

(1) HAP からの NLP 作製試験

粉碎 HAP を γ 線照射 FBS 添加培地または非照射 FBS 添加培地でインキュベートした結果を図 1 に示す。 γ 線照射 FBS 添加培地では吸光度が上昇したが、非照射 FBS 添加培地では上昇は見られなかった。このことから、 γ 線照射 FBS 中の成分が NLP の形成を促進することが示唆された。

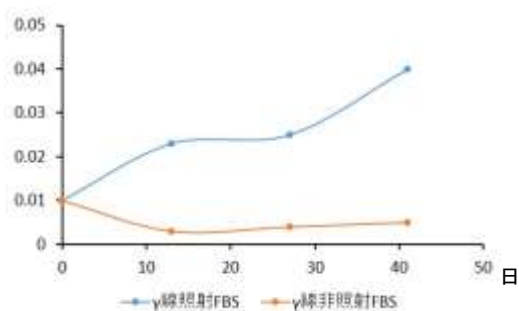


図 1. 粉碎 HAP を γ 線照射 FBS 存在下でインキュベートした培地の吸光度の推移

(2) 酸化脂質(oxLig-1)添加による NLP 形成への影響

酸化脂質の例として oxLig-1 を含むリポソームを無菌的に調製した。oxLig-1 は酸化 LDL に含まれるコレステロールエステルの酸化体である。このリポソームを γ 線非照射 FBS で培養してきた NLP の培地に添加した場合、oxLig-1 を含まない対照リポソームを添加した場合に比べて 28 日目以降、有意に吸光度が上昇した ($n=3, p<0.01$)。

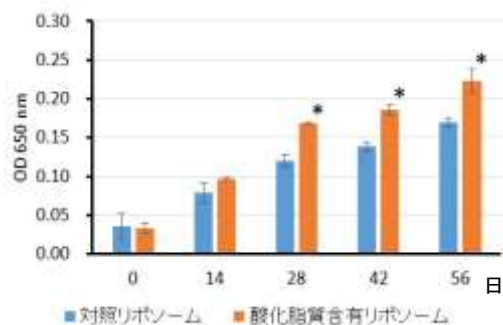


図 2. 酸化脂質(oxLig-1)リポソーム添加の NLP 増殖への影響

この結果から、oxLig-1 が NLP 形成の足場となりうることが示唆された。

(3) NLP からの脂質抽出と MS 解析

γ 線照射 FBS で形成した NLP に特徴的な脂質を検出するため、 γ 線照射/非照射 FBS 添加により形成された NLP、および酸化脂質(oxLig-1)含有/非含有リポソームの添加により成長した NLP のそれぞれから抽出した脂質の薄層クロマトグラフィー (TLC) を行った。

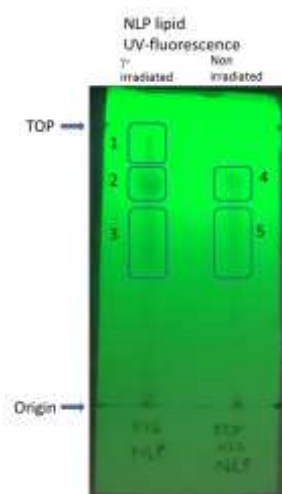


図 3. γ 線照射 FBS 添加培養 NLP の TLC 解析

さらに、TLC 解析により得られた各分画を用いて、MALDI-TOF-MS および MS/MS を行った。MS 解析により γ 線照射 FBS より抽出した脂質から酸化脂質が検出され、MS/MS により 7-Ketocholesterol とそのエステル体である oxLig-1 が含まれていることが明らかになった。さらに、oxLig-1 リポソーム添加により形成された NLP にも、大量の 7-Ketocholesterol と oxLig-1 が存在することが MS 解析により検出され、MS/MS により同定できた。

γ 線照射 FBS で形成した NLP から抽出した脂質からは、MS 解析により、コレステロール、スフィンゴミエリン、Lyso-PC 等が検

出された。Lyso-PC は、酸化の初期段階によく現れる酸化脂質である。コレステロール酸化の最終段階だと思われる 7-Ketocholesterol および oxLig-1 を検出するためには、さらに長期的に NLP を大量に培養する必要があると考えられる。

(4) 電子顕微鏡による NLP の観察

γ 線照射 FBS を添加した NLP は非照射 FBS 添加の NLP と比較してより大きく、丸みを帯びていた。

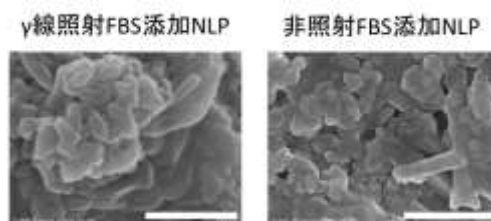


図 4. γ 線照射または非照射 FBS 添加培養 NLP の走査型電子顕微鏡による観察 Bar: 500 nm

(5) 臨床検体および疾患モデルマウスの組織染色

患者由来の組織織を用いて、異所性石灰化病巣の免疫組織染色とイメージング MS 解析を行った。腎がん、尿管がん、膀胱がんおよび腎盂がん患者の腎乳頭および腎動脈の組織切片を作り、組織染色、石灰化特異抗体による免疫染色、および MALDI-TOF-MS によるイメージング質量解析を行い、腎臓の病巣における脂質群の分布を視覚化したが、石灰化の病変そのものが観察されなかったため、石灰化好発モデルマウスを用いて検討を行った。



図 5. 石灰化好発モデルマウスの腎組織の Von Kossa 染色像

石灰化好発モデルマウスの腎臓全体における石灰化好発部位は、Von Kossa 染色および Cy5.5 で標識した NLP に対する特異抗体を用いた免疫染色により確認できた。

一般的に、腎の石灰化は、皮質・髓質・腎盂腎杯にあり、髓質～腎盂腎杯の石灰化が大部分である。間質腎石灰沈着症は腎臓の内部髓質(乳頭)に発現するのに対し、管状腎石灰沈着症はネフロンでも発現すると言われていたが、本研究では、腎乳頭における石灰化は検出できなかった。今後、臨床検体における腎組織の石灰化検出方法についてさらなる検討をし、腎組織における動脈硬化をはじめとする慢性炎症性疾患が関与する異所性石灰化の病態研究を続けたいと考えている。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

公文 裕巳 (KUMON, Hiromi)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・特命教授

研究者番号： 30144760

(2)研究分担者

松浦 栄次 (MATSUURA, Eiji)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号： 20181688

荒木 元朗 (ARAKI, Motoo)

岡山大学病院・講師

研究者番号： 90467746