

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861282

研究課題名(和文) アディポネクチンによる腎結石抑制メカニズムの解明と治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of the kidney stone formation inhibited by adiponectin and its application to treatment

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ob/obのみに結石形成を認めた。また、APN投与により結石形成の抑制を認めた。マイクロアレイ解析では、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Gene ontology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Gene ontology解析では、抗炎症作用と抗アポトーシス作用を示した。APN産生を促進させることにより治療への応用が考慮された。

研究成果の概要(英文)：The only ob/ob mice showed crystal depositions in their renal tubules. Expression analysis of genes associated with MetS-related kidney stone formation identified 259 genes that were >2.0x up-regulated and 243 genes that were <0.5x down-regulated. GO analyses revealed that the up-regulated genes belonged to the categories of immunoreaction, inflammation, and adhesion molecules. The down-regulated genes belonged to the categories of oxidative stress and lipid metabolism. Expression analysis of APN-induced genes related to stone 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：尿路結石症

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

世界における腎結石症の罹患率は、20世紀後半以降、年齢・性別・人種に関係なく増加傾向を示している。結石罹患率増加の原因として、食生活の変化、とくに脂質、動物性タンパク質摂取量の増加が指摘されている。これまでに私たちは「腎結石をメタボリックシンドローム(以下MetS)の一疾患」として捉え、腎の遺伝学的環境変化に注目し研究を行ってきた。私たちは腎結石をMetSの一疾患として捉え、腎の遺伝学的環境変化に注目し、以下の報告を行ってきた。

- (1) 腎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、腎尿細管における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) 腎結石形成モデルマウスを確立し、OPNノックアウトマウスとの比較研究によって、OPNが腎結石の形成に必須であることを明らかにした。
- (3) 腎結石モデルマウスでのマイクロアレイ解析では、結石形成に伴ってアディポサイトカイン発現が変化することを明らかにした。
- (4) 腎結石モデルラットでは、高脂肪食で腎結石形成が促進され、腎のアディポネクチン(APN)の発現が低下することを確認した。
- (5) MetSモデルマウスは、痩せ型と比べ結石形成量が増加することを確認し、結石関連遺伝子であるOPN、MCP-1の発現の亢進と酸化ストレス指標であるsodの発現低下を同定した。

以上の研究成果を踏まえ、MetSにおける結石形成モデルを用いてAPN投与による結石抑制効果を検討し、ゲノムワイド解析を行いその機序を解明する。また、尿路結石バイオマーカーを確立することにより治療および予防に応用できると考えた。

2. 研究の目的

「腎結石はメタボリックシンドローム(MetS)の一疾患」であり、動脈硬化と発症機序が似ていることを、私たちは報告した。これまでに私たちは、MetSモデルマウス(ob/ob)を用いて結石形成モデルを作成し、MetSにおいて結石形成が促進することを確認した。また、MetS予防因子であるアディポネクチン(APN)の腎における発現が、結石形成に伴って低下することも見出した。これらの結果を踏まえ、本研究では、APNが腎結石の治療、予防へ応用できるのではないかと考え、次の3つの研究を

行う。

- (1)MetSモデルマウスにおけるAPN投与による結石抑制効果の検討
- (2)マイクロアレイ解析を用いたMetSによる結石形成促進機序とAPNによる結石抑制機序の解明
- (3)尿路結石バイオマーカーの確立としてヒトにおけるAPNおよび結石関連蛋白の検討

3. 研究の方法

- (1)MetSモデルマウスにおけるAPN投与による結石抑制効果の検討

MetSモデルマウスとして、ob/obマウス(B6.V-Lep^{ob}/J)を購入し、当大学動物実験センターにて管理、交配させ、研究での必要数(wild type, ob/obマウス各30匹)まで繁殖する。ob/obマウスのgenotypingは、TaqMan® probeを用いたSNP typing assayの技術を応用したプライマー・TaqMan probe®を設計、方法を確立している。また、ob/obマウスのみ結石形成を認める指摘濃度もGOX50mg/kgと確立している。以下に分けて行う。

結石形成量：ob/obマウスに対して50mg/kgGOX腹腔内投与群(6匹)と50mg/kgGOX腹腔内投与+2.5µg/ml,0.2mlAPN皮下投与群にわけ検討する。投与6日目にsacrificeし、血清、腎を採取する。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を用いて結石形成量を定量化する。

結石関連物質の測定：投与0、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0、6日目にsacrificeし採取した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。

- (2)マイクロアレイ解析を用いたMetSによる結石形成促進機序と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(~、図1)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) を用いて検討する。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 (-) 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 の遺伝子群を除いたもの (- - -) 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 以上を示した遺伝子群と 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。

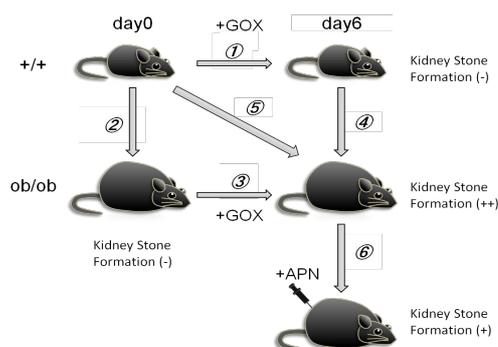


図1 マイクロアレイ解析のモデル

(3) 尿路結石バイオマーカーの確立としてヒトにおける APN および結石関連蛋白の検討

ヒトの尿路結石関連物質の探索は、結石および血液・尿データを用いた解析が行われてきたが、個々のタンパク質あるいはプロテオミクス解析による膨大なデータからの総合的な探索が主であったため、真に結石メカニズムの制御因子となる蛋白を同定できた報告は少ない。本研究では、研究成果に基づき、APN および結石関連蛋白ヒト制御因子を探索する。

検体の採取方法：名古屋市立大学病院泌尿器科 尿路結石専門外来に通院する尿路結石症患者(50名)と、一般外来を受診する良性疾患患者(50名)の血液・尿検体を同意の下に採取する。

マルチプレックス解析による腎結石関連マーカーの同定：マルチプレックス解析システム (MAGPIX®) によって、MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Panel 上の関連蛋白を同一検体から定量する。研究(2)の同定遺伝子や Gene Ontology 解析で得られた結果から測定マーカーを選択する。腎結石患者が統計学的に有意に高値または低値を示す項目を検出する。

4. 研究成果

wild type は結石形成を認めなかったが、ob/ob は結石形成を認めた ($p=0.0004$)。また、APN 投与により結石形成の抑制を認めた ($p=0.005$)。血清、尿中の結石関連物質は群間に有意差はなかった ($p>0.05$)。OPN と MCP-1 は GOX 投与 6 日目の ob/ob で wild type と比べ有意に発現増加した ($p=0.02$, $p=0.004$)。一方、SOD と APN は有意に発現低下した ($p=0.008$, $p=0.049$)。また、APN 投与による結石関連遺伝子の発現変化は認めなかった。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。特に発現の変化が著しかったのは、Cd44 (CD44)、Lyz1 (LYZ1) と Vcam1 (VCAM1) の増加 (Fold change: 13.15, 15.48, 17.64) と Slc12a1 (SLC12A1) と Slc7a13 (SLC7A13) の低下 (Fold change: 0.174, 0.220) であった。これらの Gene ontology 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。特に発現の変化が著しかったのは、Aurka (AURKA) および Tk1 (TK1) の増加 (Fold change: 3.065, 2.823) と Stat3 (STAT3) の低下 (Fold change: 0.341) であった。これらの Gene ontology 解析では、抗炎症作用と抗アポトーシス作用を示した。ヒト尿中サイトカイン・ケモカインを同時測定し、結石群には炎症性マクロファージ (M1) 誘導因子が高く、多変量解析にて結石形成には IL-4 が低値であることが検出された。

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 2 件)

1. 藤井 泰普、岡田 淳志、田口 和己、安藤 亮介、安井 孝周、尿路結石と糖尿病、腎臓内科・泌尿器科、査読有、2016、3(6) : 598-602
<http://www.kahyo.com/item/N201606-036>
2. 岡田 淳志、田口 和己、藤井 泰普、濱本 周造、安藤 亮介、安井 孝周、尿路結石とメタボリック症候群、泌尿器外科、査読有、2017、30(2):133-141
<http://www.igakutosho.co.jp/magazine/urinary/2017/zh3002.html>

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 藤井 泰普、田口 和己、岡田 淳志、杉野 輝明、海野 怜、宇佐美 雅之、濱本 周造、安藤 亮介、神谷 浩行、伊藤 恭典、戸澤 啓一、郡 健二郎、安井 孝周：メタボリックシンドロームにおける腎結石とマクロファージとの関連性の検討。第 66 回日本泌尿器科学会中部総会、2016.10.27-30、四日市市文化会館（三重県四日市市）
2. Hirose Yasuhiko, Taguchi Kazumi, Fujii Yasuhiro, Niimi Kazuhiro, Usami Masayuki, Kobayashi Takahiro, Hirose Masahito, Okada Atsushi, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro, Mokoena Mpho, Rodgers Allen: Inhibitory effect of Rooibos tea on urinary stone formation in a rat model. 13th International Symposium on Urolithiasis, 2016.7.19-22, 幕張メッセ（千葉県千葉市）
3. Fujii Yasuhiro, Okada Atsushi, Taguchi Kazumi, Ito Yasuhiko, Usami Masayuki, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Itoh Yasunori, Sakakura Takeshi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Effects of atherosclerosis-related factors on renal crystal formation in a mouse model of metabolic syndrome. 13th International Symposium on Urolithiasis, 2016.7.19-22, 幕張メッセ（千葉県千葉市）
4. Usami Masayuki, Fujii Yasuhiro, Hirose Yasuhiko, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Okada Atsushi, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Gao Bing, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Nnt gene suppresses kidney stone formation and oxidative stress. 13th International Symposium on Urolithiasis, 2016.7.19-22, 幕張メッセ（千葉県千葉市）
5. Okada Atsushi, Unno Rei, Taguchi Kazumi, Fujii Yasuhiro, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Macrophage-derived cytokines and chemokines may be new markers for calcium oxalate stone formation risk in humans. 13th International Symposium on Urolithiasis, 2016.7.19-22, 幕張メッセ（千葉県千葉市）
6. 岡田 淳志、海野 怜、田口 和己、藤井 泰普、濱本 周造、安藤 亮介、戸澤 啓一、郡 健二郎、安井 孝周：腎結石患者に特異的な尿中マクロファージ関連マーカーの同定。第 59 回日本腎臓学会学術集会、2016.6.17-19、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
7. 海野 怜、田口 和己、藤井 泰普、濱本 周造、安藤 亮介、岡田 淳志、戸澤 啓一、郡 健二郎、安井 孝周：腎結石形成におけるオートファジーの関与と機能解析。第 59 回日本腎臓学会学術集会、2016.6.17-19、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
8. Okada Atsushi, Taguchi Kazumi, Fujii Yasuhiro, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Sasaki Shoichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Identification of urinary macrophage-related factors specific to patients with calcium oxalate stones using multiplex analysis. American Urological Association Annual Meeting 2016, 2016.5.6-10, San Diego, USA
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. Okada Atsushi, Unno Rei, Fujii Yasuhiro, Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Identification of the urinary macrophage-and neutrophil-related factors as new risk indexes for patients with urinary stones 尿路結石患者の新たなリスク因子となる尿中マクロファージ・好中球関連因子の同定。第 104 回日本泌尿器科学会総会、

- 2016.4.23-25、仙台国際センター、東北大学百周年記念会館（宮城県仙台市）
11. 安藤 亮介、鈴木 貞夫、細野 晃弘、山田 珠樹、田口 和己、藤井 泰普、岡田 淳志、戸澤 啓一、郡 健二郎、安井 孝周：「尿路結石症研究の最前線」メタボリックシンドロームと尿路結石。第 104 回日本泌尿器科学会総会、2016.4.23-25、仙台国際センター、東北大学百周年記念会館（宮城県仙台市）
 12. 藤井 泰普、太田 裕也、池上 要介、永田 大介、丸山 哲史、安井 孝周：当院における ECIRS(endoscopic intrarenal surgery)の導入初期の治療成績の検討。第 104 回日本泌尿器科学会総会、2016.4.23-25、仙台国際センター、東北大学百周年記念会館（宮城県仙台市）
 13. 廣瀬 泰彦、海野 怜、伊藤 靖彦、藤井 泰普、田口 和己、宇佐美 雅之、濱本 周造、安藤 亮介、岡田 淳志、戸澤 啓一、郡 健二郎、アレン ロジャース、安井 孝周：腎結石モデルラットを用いたルイボス茶の結石抑制作用の検討。第 104 回日本泌尿器科学会総会、2016.4.23-25、仙台国際センター、東北大学百周年記念会館（宮城県仙台市）
 14. 藤井 泰普、太田 裕也、池上 要介、永田 大介、丸山 哲史、岡田 淳志、田口 和己、濱本 周造、安藤 亮介、矢内 良昌、坂倉 毅、戸澤 啓一、郡 健二郎、安井 孝周：肥満における腎結石形成では腎の動脈硬化関連因子の発現が亢進する。第 65 回日本泌尿器科学会中部総会、2015.10.23-25、長良川国際会場、岐阜都ホテル（岐阜県岐阜市）
 15. 岡田 淳志、海野 怜、田口 和己、遠藤 純央、小林 隆宏、廣瀬 泰彦、藤井 泰普、宇佐美 雅之、浜本 周造、安藤 亮介、矢内 良昌、伊藤 恭典、戸澤 啓一、安井 孝周、郡 健二郎：マルチプレックス解析を用いたシュウ酸カルシウム患者に特異的な尿中マクロファージ関連因子の同定。日本尿路結石症学会第 25 回学術集会、2015.8.28-29、ロワジュールホテル旭川（北海道旭川市）
 16. 岡田 淳志、安井 孝周、田口 和己、海野 怜、藤井 泰普、濱本 周造、広瀬 真仁、戸澤 啓一、郡 健二郎：シュウ酸カルシウム結石患者に特異的な新規尿中因子 IL-4 の同定。第 103 回日本泌尿器科学会総会、2015.4.18-21、石川県立音楽堂、ANA クラウンプラザ金沢 他（石川県金沢市）
 17. 藤井 泰普、岡田 淳志、左 立、市川 潤、田口 和己、濱本 周造、池上 要介、永田 大介、安井 孝周、丸山 哲

史、戸澤 啓一、郡 健二郎：腎尿細管細胞・脂肪細胞・マクロファージの共培養システムを用いたメタボリックシンドローム環境下の結石形成機序の解明。第 103 回日本泌尿器科学会総会、2015.4.18-21、石川県立音楽堂、ANA クラウンプラザ金沢 他（石川県金沢市）

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