

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09530

研究課題名(和文)メタボリックシンドロームにおける細胞接着分子の発現と腎結石促進機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the expression of cell adhesion molecules and the mechanism of kidney stone promotion in metabolic syndrome

研究代表者

藤井 泰普 (Fujii, Yasuhiro)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：30566229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：グリオキシル酸50mg/kgを各マウス投与し、MetSモデルマウスにおける結石モデルを作成した。血清、尿中における脂質関連物質ではWT、ob/ob間で有意差を認めた($p<0.05$)。WTでは結石形成を認めなかったが、ob/obでは有意に腎結石が形成された。マイクロアレイ解析により2群間に有意差をもつ遺伝子群の中から接着に関連するSpp1、Fn1、Icam1、Col3a1の4遺伝子を同定した。4遺伝子の定量PCR・免疫染色では、ob/obは、WTと比べ有意に発現が多かった($p<0.05$)。TNF- α も同様の結果であった($p<0.05$)。また、培養細胞を用いた研究でも同様の結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎結石は90%の無機物質と数%の有機物質から構成されており、その有機物質の成分としてオステオポンチン(OPN)などが同定され、遺伝子レベルで腎結石の病態解明が進んでいるが、予防法に応用されていないのが現状である。現在、MetSは社会問題となっており、特に予防医学において重要視されている。MetSは糖尿病、高血圧症、動脈硬化症を初めとする諸疾患の原因になっているが、腎結石も同様にMetSの一疾患である。MetSに伴う結石形成機序は解明されていないため、本研究による結石形成機序の解明は、これらの研究による成果は、結石に対する新たな予防法や予防薬、治療薬の開発に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Glyoxylate(50mg/kg) was administered to each mouse to create a stone model in MetS model mice. There was a significant difference in lipid-related substances in serum and urine between WT and ob/ob ($p<0.05$). No stone formation was observed in WT, but significant renal stone formation was observed in ob/ob. Microarray analysis identified four genes related to adhesion, Spp1, Fn1, Icam1, and Col3a1, among the genes with significant differences between the two groups. Quantitative PCR and immunostaining of 4 genes revealed that ob/ob was significantly more expressed than WT ($p<0.05$). Similar results were obtained for TNF- α ($p<0.05$). Similar results were also obtained in studies using cultured cells.

研究分野：Urolithiasis

キーワード：腎結石 細胞接着分子 メタボリックシンドローム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎結石症の罹患率は、世界中で増加している。その増加の原因として、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 MetS の一疾患」として捉え、腎の遺伝学的環境変化に注目し、MetS モデルマウスにシュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸を投与したところ、痩せ型と比較して結石形成量が増加することを見いだした。さらに、MetS 環境下における結石関連遺伝子としてフィブロネクチン、ICAM1 の細胞接着分子を同定した。そこで私たちは、以下の関連性に着目した。

腎結石と MetS : 腎結石の成因は MetS と関連していると近年考えられている。Taylor らは 20 万人の追跡調査により、肥満・体重増加と腎結石リスクとの関連性を示した。一方、我が国においても、尿路結石患者において、肥満(BMI $\geq 25\text{kg/m}^2$)、高血圧、高脂血症、糖尿病などの MetS 因子を有することが結石形成リスクを高めると報告された。

MetS と細胞接着分子 : 高脂血症(高 LDL 血症)は MetS の主病態である。また、動脈硬化の発症機序は、血管内皮細胞に発現した細胞接着分子が血中 LDL と共に白血球を間質へ移動させ動脈硬化巣を形成する。この際に細胞接着因子であるセレクチン、フィブロネクチン、ICAM1 をはじめとして細胞接着分子の発現増加が明らかとなっている。

腎結石と細胞接着分子 : 結石形成においても細胞接着因子であるフィブロネクチン、ICAM1 が結石形成時にその発現が増加し結石関連遺伝子の 1 つであると報告されている。しかし、その機序は明らかになっていない。

これらをふまえ、MetS 環境下における細胞接着分子が結石形成に重要な役割を担っているのではないかとの着想に至った。その解明が結石に対する新たな予防法や予防薬、治療薬の開発に役立つと考えられる。

2. 研究の目的

近年の尿路結石研究では遺伝子発現の解析や結石内蛋白の解析がされている。尿路結石予防を目指し多くの研究がされてきたが、臨床応用される予防法や予防薬の開発には至っていない。現在、MetS は社会問題となっており、特に予防医学において重要視されている。MetS は糖尿病、高血圧症、動脈硬化症を初めとする諸疾患の原因になっている。また、腎結石も同様に MetS の一疾患である。今までに MetS に伴う結石形成機序は解明されていないため、本研究による結石形成機

序の解明は急務である。今後、これらの研究による成果は、結石に対する新たな予防法や予防薬、治療薬の開発に役立つと考えられる。

3. 研究の方法

はじめに、MetS モデルマウスを用いて結石形成量を検討し、摘出腎での細胞接着分子を評価する(研究 1)。次いで、2 種類の培養細胞を用いて非接触・接触法により、サイトカインと細胞接着分子との関連を評価する。(研究 2)

[研究 1 MetS 環境下における結石作成と細胞接着分子の発現評価]

MetS モデルマウス(ob/ob、B 6.V-Lepob/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る。ob/ob マウス(B6.V-Lepob/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。すでに ob/ob マウスの genotyping は、尻尾より抽出した DNA に対し PCR を行い、制限酵素による PCR 産物の断片化をゲル電気泳動にて確認している。繁殖の間、正確な genotyping のために、TaqMan® probe を用いた SNP typing assay の技術を応用したプライマー・TaqMan probe®の設計も確立している。さらに、シュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸の腹腔内投与で、ob/ob マウスのみに結石形成を認める至適濃度も 50 mg/kg と確立している。

・結石モデルの作成: wild type と ob/ob マウスに対し、グリオキシル酸を腹腔内投与(各 6 匹)し結石形成モデルを作成する。

・結石関連物質の測定: 投与 0 日目と投与 5 日目に 24 時間蓄尿を各マウスに行い、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)を測定する。

・結石形成量・形態の評価: 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 software を用いて結石形成量を定量化する。

・細胞接着分子・結石マトリックスの評価: 摘出腎において各遺伝子、蛋白発現を定量し、PCR、免疫染色、Western blotting にて検討する。(細胞接着分子: フィブロネクチン、ICAM1、セレクチン、VCAM1、コラーゲン 結石マトリックス: オステオポンチン、サイトカイン: TNF- α)

また、グリオキシル酸の投与後の時間、日数などの期間を調節することにより結石形成初期における結石形成量、形態、細胞接着分子(フィブロネクチン、ICAM1、セレクチン、VCAM1、コラーゲン)、結石マトリックス(オステオポンチン)、サイトカイン(TNF- α)の経時的変化を評価する。このことから腎結石形成における細胞接着分子の発現変化を確認することで初期形成に関連しているのか、結石形成後に関連しているのかを検証しその機序を明らかにする。

【研究 2 脂肪細胞が関与する腎尿管上皮細胞 (M-1) とシュウ酸カルシウム一水和物 (COM 結晶) の接着能の検討】

アディポサイトカインの機能解析を目的として私たちが確立した脂肪細胞とマウス尿管上皮細胞 (M-1) を用いた共培養研究法でおこなう⁵⁾。マウス尿管上皮細胞 (M-1) のシュウ酸カルシウム一水和物 (COM) 結晶付着能と付着した結晶形態、サイトカインの発現について評価する。さらに、MetS 環境を再現するために脂肪細胞との共培養によって評価する。培養液を回収し細胞接着分子 (フィブロネクチン、ICAM1、セレクチン、VCAM1、コラーゲン)、結石マトリックス (オステオポンチン)、サイトカイン (TNF- α) の遺伝子、蛋白発現を定量 PCR、Western blotting にて評価する。結晶接着能の定量は、¹⁴C で作成した COM 結晶を用いて行い添加する COM 結晶の濃度は 33 ~ 267 g/cm² とする。以下の 3 群に分けて検討する。

control 群: 各々の培養液を回収し評価 (M-1 細胞、3T3L-1 細胞、M-1 細胞 + COM 結晶添加、3T3L-1 細胞 + COM 結晶添加)

非接触法群: M-1 細胞/3T3L-1 細胞の培養液を交換後に培養液を回収し評価 (M-1 細胞、3T3L-1 細胞、M-1 細胞 + COM 結晶添加、3T3L-1 細胞 + COM 結晶添加)

接触法群: 上層に M-1 細胞、下層に 3T3L-1 細胞とし、培養液を回収しパラクラインとして評価 (M-1 細胞 + 3T3L-1 細胞、M-1 細胞 + 3T3L-1 細胞 + COM 結晶添加)

COM 結晶添加 0、0.5、1、6、12、24 時間後に結晶接着能と測定項目の評価を行う。まずは安定した cell line の確立、培養液条件、交換条件の確立が必須であり control、非接触法、接触法の順で研究を行う。

4. 研究成果

研究 1: メタボリックシンドローム (MetS) 環境下における結石作成と細胞接着分子の発現評価-In vivo 研究では、グリオキシル酸 50mg/kg を各マウス投与し、MetS モデルマウスにおける結石モデルを作成した。血清、尿中における結石関連物質は WT、ob/ob 間、グリオキシル酸投与前後で比較しても有意差は見られなかった。一方、脂質関連物質では WT、ob/ob 間で有意差を認めた ($p < 0.05$)。ただし、投与前後では有意差を認めなかった。WT では結石形成を認めなかったが、ob/ob では有意に腎結石が形成された。Gene ontology 解析では、分子機能のうち接着のカテゴリーの比率が最も高く (68.6%)、有意差を認めた。マイクロアレイ解析により 2 群間に有意差をもつ遺伝子群の中から接着に関連する Spp1、Fn1、Icam1、Col3a1 の 4 遺伝子を同定した。4 遺伝子の

定量 PCR では、ob/ob は、WT と比 べ有意に発現が多かった ($p < 0.05$)。また、TNF- α も有意に発現していた ($p < 0.05$)。タンパクでも同様に有意に発現していた ($p < 0.05$)。

研究 2: 脂肪細胞が関与する腎尿管上皮細胞 (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-In vitro 研究では、M1 細胞を回収し Spp1、Fn1、Icam1、Col3a1、Tnf- α の 5 遺伝子を定量 PCR した。4 遺伝子の定量 PCR では脂肪細胞との共培養により発現亢進を認めた ($p < 0.05$)。また、培養液を回収し OPN、FN、ICAM1、COL3A1、TNF- α の免疫染色においても、脂肪細胞との共培養では有意に発現が多かった ($p < 0.05$)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sugino Teruaki, Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Okada Tomoki, Isogai Masahiko, Tanaka Yutaro, Unno Rei, Fujii Yasuhiro, Hamakawa Takashi, Ando Ryosuke, Okada Atsushi, Yasui Takahiro	4. 巻 v18i
2. 論文標題 Risk Factors for Failure of Endoscopic Management of Stone-related Ureteral Strictures	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Urol J	6. 最初と最後の頁 6697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.22037/uj.v18i.6697	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 -

1. 著者名 安藤 亮介、杉野 輝明、海野 怜、藤井 泰普、田口 和己、瀧本 周造、岡田 淳志、安井 孝周	4. 巻 14(6)
2. 論文標題 生活習慣と尿路結石	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 泌尿器科	6. 最初と最後の頁 657-665
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 Unno Rei, Taguchi Kazumi, Fujii Yasuhiro, Unno Naoko, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Nakane Akihiro, Okada Atsushi, Kamiya Hiroyuki, Yasui Takahiro	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Surgical hand hygiene and febrile urinary tract infections in endourological surgery: a single-centre prospective cohort study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-71556-z	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9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田 淳志、磯谷 正彦、茶谷 亮輔、岡田 朋記、服部 竜也、河瀬 健吾、田中 勇太郎、杉野 輝明、海野 怜、加藤 大貴、藤井 泰普、田口 和己、新實 和寛、廣瀬 泰彦、小林 隆宏、瀧本 周造、宇佐美 雅之、広瀬 真仁、安藤 亮介、伊藤 靖彦、左立、高兵、戸澤 啓一、郡 健二郎、安井 孝周
2. 発表標題 「基礎研究」から科学する
3. 学会等名 日本尿路結石症学会第31回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 磯部 輝紀、田中 勇太郎、藤井 泰普、神谷 浩行、安井 孝周
2. 発表標題 当院における高齢者に対するTUL 治療の臨床的検討
3. 学会等名 第71回日本泌尿器科学会中部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井 泰普、権田 将一、小早川 祐輝、飯田 啓太郎、神谷 浩行、安井 孝周
2. 発表標題 当院における日本製 PTFE メッシュ(ORIHIME)を用いた TVM 手術の初期治療成績と工夫
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 権田 将一、藤井 泰普、田中 勇太郎、飯田 啓太郎、神谷 浩行、安井 孝周
2. 発表標題 当院における腹腔鏡下膀胱全摘除術の初期成績
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 磯部 輝紀、田中 勇太郎、藤井 泰普、神谷 浩行、安井 孝周
2. 発表標題 アキシチニブ・アベルマブ併用治療が著効したrenal spindle cell carcinomaの一例
3. 学会等名 第288回日本泌尿器科学会東海地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井 泰普、田口 和己、権田 将一、小早川 祐輝、海野 怜、飯田 啓太郎
2. 発表標題 術者の手指消毒は泌尿器内視鏡手術における手術部位感染の発症に影響しない
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 権田 将一、小早川 祐輝、海野 怜、飯田 啓太郎、藤井 泰普、田口 和己、神谷 浩行、安井 孝周
2. 発表標題 当院における75歳以上の高齢者の尿路結石に対するTULについての臨床的検討
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小早川 祐輝、権田 将一、海野 怜、飯田 啓太郎、藤井 泰普、田口 和己、神谷 浩行、安井 孝周
2. 発表標題 当院における60W Ho:YAGレーザーを使用したTULの治療成績の検討
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 権田 将一、藤井 泰普、海野 怜、飯田 啓太郎、田口 和己、神谷 浩行、安井 孝周
2. 発表標題 当院における上部尿路結石に対する軟性尿管鏡を用いた経皮的碎石術の臨床的検討
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

〔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
研究分担者	田口 和己 (taguchi kazumi) (00595184)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	
研究分担者	安藤 亮介 (ando ryosuke) (30381867)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	戸澤 啓一 (tozawa keiichi) (40264733)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	安井 孝周 (yasui takahiro) (40326153)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	岡田 淳志 (okada atsushi) (70444966)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	
研究分担者	濱本 周造 (hamamoto shuzo) (80551267)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	

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
---------	---------