

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24689060

研究課題名(和文) マクロファージによる腎結石貪食作用の機能解析と溶解療法への応用

研究課題名(英文) The functional analysis of kidney stone-phagocytosis activity by the macrophages and the application to dissolution therapy.

研究代表者

岡田 淳志 (Okada, Atsushi)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70444966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、腎結石の自然消失現象の主体がM₂の「腎結石貪食機能」であると位置付け、新たな腎結石予防因子としてM₂の機能を制御する技術を確立することが目的であり、動物モデル、ヒト検体、培養細胞を用いて以下の3つの研究を行い、成果を得た。

[1] M₂機能不全マウス(op/op)の結石形成量増加から、M-CSFで誘導されるM2-M₂の結石防御能を同定した。[2]ヒト尿のマルチプレックス解析によって、尿中IL-4が低値であることが結石形成に關与する可能性を示した。[3]培養M₂を用い、貪食されたCOM結晶がM₂のリソゾーム内で酸性環境に暴露され、経時的に消失することを認めた。

研究成果の概要(英文)： This study is aimed establish a technique to control the function of macrophages as a new prevention factor for kidney stone formation by positioning that the main constituent of the "stone elimination" phenomenon is "the kidney stone-phagocytosis activity" of M₂, and we performed three following studies using an animal model, human specimen and culture model.

[1] We identified stone-preventive ability of M-CSF-derived M2-M₂ by increased stone formation in M₂-deficient mice (op/op). [2] We showed the possibility that lower urinary IL-4 related in stone formation using multiplex analysis. [3] Using culture M₂, we identified that the englobed COM crystals were revealed in lysosomes of M₂ with acidified environment and disappeared over time.

研究分野：医歯薬学

キーワード：尿路結石 マクロファージ op/opマウス マルチプレックス解析 結晶貪食モデル

1. 研究開始当初の背景

(1)本研究に関連する国内・国外の研究動向および位置付け

わが国の腎結石症の発症率は、この40年間で約3倍にも増加し、5年再発率も40~50%と難治性である。しかし予防治療薬として新たに認可された薬剤は皆無であり、形成機序の解明と再発予防法の確立が急務である。これまでの腎結石の予防法は飲水と食事療法を中心とした、尿中の無機物質の制御が主流であったが、腎結石は依然として増加の一途を辿っている。私たちは、結石成分の数%を占める有機物質(結石マトリックス)に着目し、腎結石に遺伝的要因が強く関与することを明らかにするとともに、動物モデルを用いた結石形成機序の解明に取り組んで来た。

(2)これまでの研究成果を踏まえ、着想に至った経緯

これまでの結石学では、ラットでの腎結石モデルが一般的に用いられてきた。私たちは、腎結石形成には腎の遺伝学的環境変化が重要であると考え、遺伝子改変技術の確立したマウスでの腎結石モデルの確立に成功した。その研究過程において、一度できた腎の微小結石が自然消失するという現象を世界で初めて捉えることに成功した。この現象は、「一度できた腎結石は排石するか、増大するしかない」とするこれまでの概念を覆すものとして、国内外から高い評価を得た。私たちは、この微小結石消失現象のメカニズムを解明するため、マイクロアレイ解析を行い、腎結石の形成と消失には①腎尿管細胞への結晶の付着、②結晶塊の間質移行、③ケモカイン・M-CSF(macrophage-colony stimulating factor)などのM ϕ 走化因子発現、④単球の走化・分化・血管内皮細胞との接着、⑤M ϕ の成熟・貪食・細胞内消化・抗原提示・TGF- β 産生という、一連の腎結石の貪食処理メカニズムが推測された。さらに透過型電子顕微鏡の観察では、M ϕ が腎結石を貪食している像を捉えることができた。以上より、マウスは非常に高い腎結石の処理能力を有する事が伺え、M ϕ がこの現象に強く関与していることが示唆された。

(3)これまでの研究成果に基づいた研究状況

私たちは macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)が欠損したM ϕ 機能不全マウス(op/op)を用いて腎結石形成実験を行った。その結果、op/opの腎結石量は、野生型(+/+)より有意に多く、M ϕ が腎結石を抑制する機能を有する可能性を見いだした。また腎結石の関連遺伝子に関わる遺伝子改変マウス・変異マウスを用いた研究においても、腎結石形成過程にM ϕ が重要な機能を有する可能性を見いだしている。さらにヒトの腎摘除組織を用いて、腎結石患者よりも非結石患者のほうが腎間質の結石数が少なく、腎のM ϕ 数が多いことを確認した。

これらの成果より、健常者には腎結石が増大する前にこれを除去するメカニズムが備わ

っており、M ϕ が腎結石を貪食・処理する機能が破綻することによって、腎結石増大につながるものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、M ϕ が腎結石防御メカニズムの中心をなすものとして以下の3方法により機能解析を行うとともに、この成果から新たな予防治療薬へとつながる知見を得ることである。

(1) M ϕ 機能不全マウス(op/op)へのM-CSF投与による腎結石予防効果

(2) 結石形成に関わるヒト血中・尿中炎症関連蛋白のマルチプレックス解析

(3) 共培養システムを用いたM ϕ 結晶処理機能の制御法の開発

3. 研究の方法

(1) M ϕ 機能不全マウス(op/op)へのM-CSF投与による腎結石予防効果

・op/opの繁殖とgenotyping法の確立

op/opを必要な頭数(op/opと野生型各30匹程度)まで繁殖する。Op/opのgenotypingは、尻尾より抽出したDNAのCsf1変異領域を含む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する。また繁殖の間、より簡便で正確な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の設計を行う。

・本実験

8週齢雄のop/opおよび野生型に対し、腎結石モデルマウスの手法に順じ、シュウ酸前駆物質グリオキシル酸(GOx) 80mg/kgを6日間腹腔内投与を行う。また組換え型ヒトM-CSF(rhM-CSF)を濃度系列(0.1, 1.0, 5.0, 10 μ g/body)にて併行投与する群を設定する。6日目に腎検体・血液の採取と24時間蓄尿を行う。血液検体および尿検体は、結石関連無機物質およびMAGPIXシステムによって約50種類の炎症関連因子をマルチプレックス解析にて同時測定する。腎結石形成は、シュウ酸カルシウム染色(Pizzolato染色)と偏光顕微鏡により同定し、画像解析ソフトで(Image Pro Plus®)で定量化する。腎M ϕ は、マウス染色(F4/80染色)により同定する。関連遺伝子発現については、免疫染色、Western blottingおよび定量PCRによって同定する。

(2) 結石形成に関わるヒト血中・尿中炎症関連蛋白のマルチプレックス解析

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、私たちの研究成果に基づき、結石形成・防御に関与するヒトM ϕ 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 尿路結石専門外来を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(前立腺肥大症など)(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尿路結石関連炎症マーカーの同定

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 上の約 50 種類の炎症・免疫関連蛋白質を同一検体から定量する。この結果より、尿路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。

(3) 共培養システムを用いた Mφ 結晶処理機能の制御法の開発

私たちはこれまでに、結石の原因物質であるシュウ酸カルシウム 1 水和物(COM)結晶の尿細管上皮細胞への付着によって、MCP-1 や OPN の発現が増加することを確認している。本研究では、COM 結晶の尿細管上皮細胞への付着による Mφ の結晶貪食・処理機能への影響を観察すると共に、(1)(2)研究で同定した炎症関連マーカーの変動を調べる。

・共培養システムの構築と COM 投与研究

マウス腎尿細管細胞(M-1)と Mφ 細胞(J774.1)を用いた共培養システムを構築し、共培養下での結晶貪食率を評価すると共に、定量 PCR および免疫染色、ELISA によって両細胞間に存在する介在因子(パラクライン)を解明する。

・同定因子を用いた Mφ 結晶処理機能の評価

M-1 細胞培地に同定した因子を投与し、COM 結晶の貪食率を測定する。

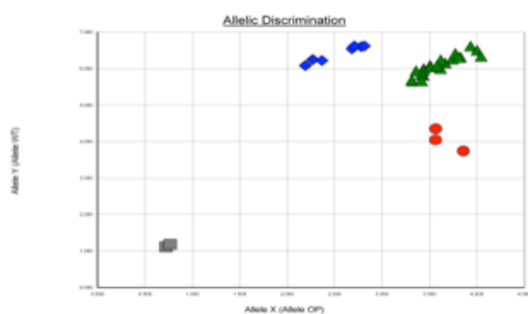
4. 研究成果

(1) Mφ 機能不全マウス(op/op)への M-CSF 投与による腎結石予防効果

・op/op の繁殖と genotyping 法の確立

TaqMan® genotyping assay を用いた M-CSF 遺伝子の mutation に着目した primer sets を開発した(図 1)。

図 1 TaqMan® assay による genotyping



・本実験

op/op に G0x 投与を行ったところ、野生型に比較して結石形成量が有意に多く、Mφ サブタイプの免疫染色では、op/op では M2 (抗炎症型 Mφ) が有意に減少していた。Op/op に対する M-CSF の投与により、M2 の遊走の遊走が促され、結石形成が減少することを確認した(図 2, 3)。さらに骨髄由来マクロファージを M2 に分化誘導させ、op/op マウスに投与した所、同様に結石形成が抑制された。

図 2. op/op における腎結石形成

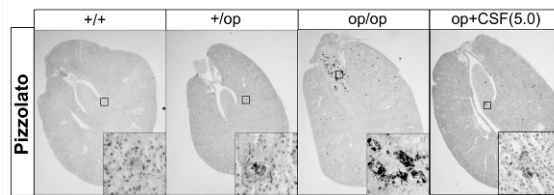
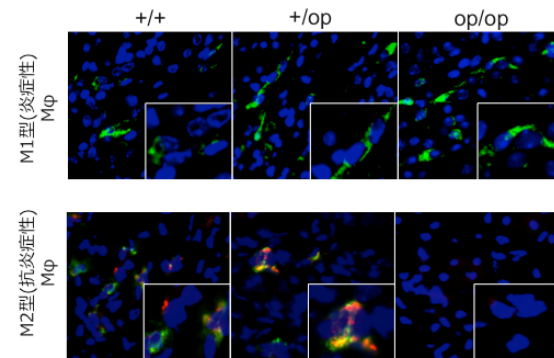


図 3. op/op における M1, M2 分布



(2) 結石形成に関わるヒト血中・尿中炎症関連蛋白のマルチプレックス解析

対象として、名古屋市立大学に通院する患者のうち、以下の除外条件を満たし同意の得られたコントロール群(56名) 尿路結石群(66名)(初発 24名, 再発 42名)から、一時尿を採取した。

【除外条件】

- ・定性: 蛋白陽性、糖陽性、潜血陽性
- ・沈渣: RBC 5/HPF 以上 WBC 5/HPF 以上
- ・明かな悪性疾患の既往
- ・膠原病などの自己免疫疾患
- ・ステロイド・免疫抑制剤の服用

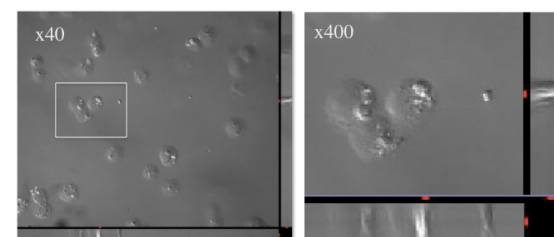
MagPix®システムを用いた研究の結果、尿エロ結石患者はコントロール群に比較して、炎症性 Mφ (M1) 関連因子である MCP-1, GRO が有意に高値であり、抗炎症性 Mφ 関連因子である IL-4 が高値であることが判明した。また多変量解析では、IL-4 のみが尿路結石形成に強く関連していた。

(3) 共培養システムを用いた Mφ 結晶処理機能の制御法の開発

共培養系を確立するために、培養 Mφ (J776.1 細胞)を用いた結晶貪食系を確立した。

①シュウ酸カルシウム 1 水和物(COM)結晶の貪食試験: 共焦点顕微鏡の Z-Stack イメージ(3次元階層イメージ解析)では、COM 結晶が J774.1 細胞の中央に位置していることが観察された(図 4)。

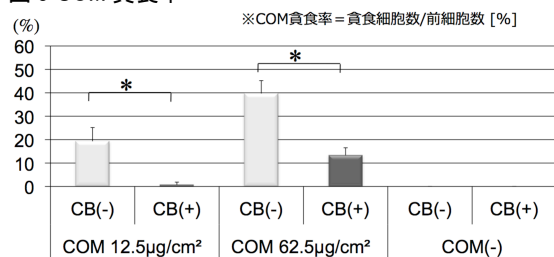
図 4 共焦点顕微鏡による COM 結晶の空間解析



さらに COM 貪食率を検討したところ、貪食阻害剤 Cytochalasin B を投与されていない J774.1 細胞は、投与された細胞よりも有意に高い貪食率を

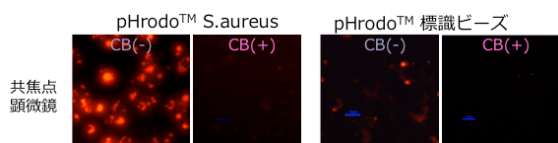
示した(図 5)。

図 5 COM 貪食率



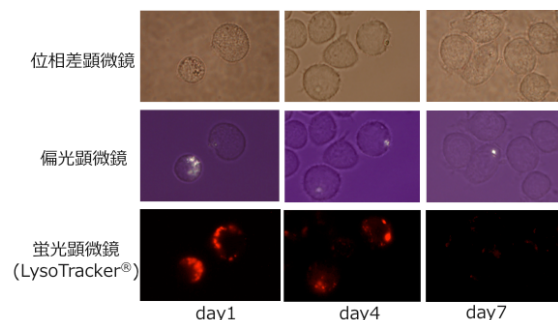
② 食食による細胞内 pH 変化試験: pH 感受性色素 pHrodo™ で標識された S.aureus 及びビーズは、J774.1 に食食されることによって、いずれも酸性環境を示す赤色に発色した(図 6)。

図 6 pHrodo™ 標識 S.aureus 及びビーズ食食



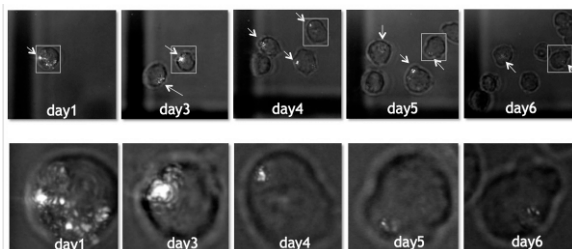
③ 食食 COM 結晶のリゾソーム局在の確認: 偏光顕微鏡によって J774.1 に食食された COM 結晶が同定された。また結晶と同部位に LysoTracker® で染色されたリゾソームが確認された(図 7)。

図 7. 食食 COM 結晶のリゾソーム局在



④ 食食 COM 結晶の追跡試験: ガラスベースディッシュでの追跡観察において、J774.1 の分裂に伴って COM 結晶が細分化され、消失していく像が観察された(図 8)。

図 8. ガラスベースディッシュでの追跡観察



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Hamamoto S, Yasui T, Okada A, Hirose M, Matsui Y, Kon Shigeyuki, Sakai Fumihiko, Kojima Y, Hayashi Y, Tozawa K, Ueda T Kohri

K: Crucial role of the cryptic peptide SLAYGLR within osteopontin in renal crystal formation of mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26:2967-2977, 2011

(doi: 10.1002/jbmr.495.)

2. Kohri K, Yasui T, Okada A, Hirose M, Hamamoto S, Fujii Y, Niimi K, Taguchi K. Biomolecular mechanism of urinary stone formation involving osteopontin. *Urol Res* 40:623-37.2012

(doi: 10.1007/s00240-012-0514-y.)

3. Niimi K, Yasui T, Hirose M, Hamamoto S, Itoh Y, Okada A, Kubota Y, Kojima Y, Tozawa K, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K: Mitochondrial permeability transition pore opening induces the initial process of renal calcium crystallization. *Free Radical Biology & Medicine*, 52:1207-1217, 2012

(doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.005.)

4. Taguchi K, Okada A, Yasui T, Kobayashi T, Ando R, Tozawa K, Kohri K : Pioglitazone, a peroxisome proliferator activated receptor γ agonist, decreases renal crystal deposition, oxidative stress and inflammation in hyperoxaluric rats. *J Urol*. 188:1002-11.2012

(doi: 10.1016/j.juro.2012.04.103.)

5. 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* 8:e61343.2013

(doi: 10.1371/journal.pone.0061343.)

6. Ichikawa J, Okada A, Taguchi K, Fujii Y, Li Z, Niimi K, Hamamoto S, Kubota Y, Umemoto Y, Itoh Y, Yasui T, Kawai N, Tozawa K, Kohri K: Increased crystal-cell interaction in vitro under co-culture of renal tubular cells and adipocytes by in vitro co-culture paracrine systems simulating metabolic syndrome. *Urolithiasis*, 42:17-28, 2014

(doi: 10.1007/s00240-013-0612-5)

7. Li Z, Okada A, Yasui T, Taguchi K, Ito Y, Hirose Y, Fujii Y, Niimi K, Hamamoto S, Ando R, Itoh Y, Zuo J, Tozawa K, Kohri K: A Paracrine Mechanism Involving Renal Tubular Cells, Adipocytes, and Macrophages Promotes Kidney Stone Formation in a Simulated Metabolic Syndrome Environment. *The Journal of Urology*, 2014

(doi: 10.1016/j.juro.2014.01.013)

8. Niimi K, Yasui T, Okada A, Hirose Y, Kubota Y, Umemoto Y, Kawai N, Tozawa K, Kohri K: Novel effect of the inhibitor of mitochondrial cyclophilin D activation, N-methyl-4-isoleucine cyclosporine, on renal calcium crystallization. *International Journal of Urology*, 2014

(doi: 10.1111/iju.12425)

9. Taguchi K, Okada A, Kitamura H, Yasui T, Naiki T, Hamamoto S, Ando R, Mizuno K,

Kawai N, Tozawa K, Asano K, Tanaka M, Miyoshi I, Kohri K. Colony-stimulating factor-1 signaling suppresses renal crystal formation. *J Am Soc Nephrol*. 25:1680-97.2014 (doi: 10.1681/ASN.2013060675.)

[学会発表] (計 28 件)

1. 岡田 淳志、濱本 周造、中岡 和徳、田口 和己、窪田 泰江、小島 祥敬、梅本 幸裕、安井 孝周：実験動物モデルとの相違点から見たヒト尿路結石形成機序の解明。第 99 回日本泌尿器科学会総会、2011.4.21-24、名古屋市
2. Okada A, Yasui T, Ichikawa J, Nakaoka K, Hirose Y, Taguchi K, Niimi K, Fujii Y, Usami M, Kobayashi T, Ando R, Hamamoto S, Hirose M, Itoh Y, Tozawa K, Kohri K: Renal macrophage migration and crystal phagocytosis via inflammatory-related gene expression during kidney stone formation and elimination in mice. *AUA* 2011, 2011.5.14-19, Washington (U.S.A)
3. Okada A, Taguchi K, Hirose Y, Niimi K, Fujii Y, Kobayashi T, Usami M, Hamamoto S, Hirose M, Itoh Y, Yasui T, Tozawa K, Kohri K: Calcium oxalate crystals could be engulfed by macrophages during kidney stone formation in vitro and in vivo models. *European Association of Urology Annual Congress* 2012, 2012.2.24-28, Paris (France)
4. 岡田 淳志、安井 孝周、田口 和己、新美 和寛、藤井 泰普、廣瀬 泰彦、宇佐美 雅之、小林 隆宏、濱本 周造、広瀬 真仁、伊藤 恭典、戸澤 啓一、郡 健二郎：マクロファージは腎結石形成過程においてシュウ酸カルシウム結晶を貪食する。第 100 回日本泌尿器科学会総会、2012.4.21-24、横浜市
5. Okada A, Yasui T, Taguchi K, Yasui T, Taguchi K, Niimi K, Fujii Y, Hamamoto S, Hirose M, Itoh Y, Tozawa K, Kohri K: Renal macrophages could engulf calcium oxalate crystals during kidney stone formation in vitro and in vivo models. *American Urological Association Annual Meeting* 2012, 2012.5.19-24, Atlanta(USA)
6. Okada A, Yasui T, Taguchi K, Niimi K, Fujii Y, Hamamoto S, Hirose M, Itoh Y, Tozawa K, Kohri K: Crystal Kinetics and Processing in Human Kidney Stone Formation: Comparison of Clinical and Pathological Findings in Stone Formers and Non-Stone Formers. *American Urological Association Annual Meeting* 2012, 2012.5.19-24, Atlanta(USA)
7. Okada A, Yasui T, Z Li, Taguchi K, Fujii Y, Itoh Y, Hirose Y, Usami M, Niimi K, Ando R, Kobayashi T, Hamamoto S, Hirose M, Itoh Y, Tozawa K, Kohri K: Active phagocytosis and processing of calcium oxalate monohydrate crystals in an in vitro macrophage model.

European Association of Urology Annual Meeting 2013, 2013.3.15-19, Milan(Italy)

8. 岡田 淳志、安井 孝周、田口 和己、藤井 泰普、濱本周造、伊藤 恭典、戸澤 啓一、郡 健二郎：腎結石の溶解療法の開発に向けたマクロファージによるシュウ酸カルシウム結晶の貪食機序の解明。第 101 回日本泌尿器科学会総会、2013.4.25-28、札幌市
9. 岡田 淳志、安井 孝周、田口 和己、伊藤 靖彦、廣瀬 泰彦、宇佐美 雅之、藤井 泰普、小林 隆宏、新美 和寛、濱本周造、広瀬 真仁、安藤 亮介、伊藤 恭典、戸澤 啓一、郡健二郎：腎結石の溶解療法の開発に向けたマクロファージのシュウ酸カルシウム結晶貪食機序の解明。日本尿路結石症学会 第 23 回学術集会、2013.8.30-31、東京都
10. Okada A, Yasui T, Taguchi K, Ito Y, Hirose Y, Fujii Y, Niimi K, Usami M, Kobayashi T, Hamamoto S, Hirose M, Itoh Y, Tozawa K, Kohri K: Macrophage-derived cytokines and chemokines may be novel markers to predict calcium oxalate stone formation in humans. 2nd Meeting of the EAU Section of Urolithiasis, 2013.9.5-7, Copenhagen
11. 岡田 淳志、安井 孝周、田口 和己、藤井 泰普、新美 和寛、濱本 周造、広瀬 真仁、戸澤 啓一、郡 健二郎：腎結石溶解療法に向けたマクロファージ機能解析。第 63 回日本泌尿器科学会中部総会、2013.11.28-30、名古屋市
12. 岡田 淳志、田口 和己、藤井 泰普、新美 和寛、濱本 周造、安井 孝周、広瀬 真仁、戸澤 啓一、郡 健二郎：マルチプレックス解析を用いた尿路結石患者に特異的な尿中マクロファージ関連因子の同定。第 102 回日本泌尿器科学会総会、2014.4.24-27、神戸市
13. Okada A, Yasui T, Taguchi K, Fujii Y, Niimi K, Hamamoto S, Hirose M, Ando R, Kubota Y, Itoh Y, Tozawa K, Kohri K: Possible new urine markers for calcium oxalate “stone formers”: macrophage-related cytokines/chemokines detected by multiplex analysis. *American Urological Association Annual Meeting* 2014, 2014.5.16-21, Orlando, USA
14. Okada A, Yasui T, Zou Li, Unno Rei, Fujii Y, Taguchi K, Hamamoto S, Ando R, Itoh Y, Tozawa K, Sasaki S, Rodgers Allen, Kohri K: A paracrine mechanism promotes kidney stone formation in a simulated metabolic syndrome environment using in vitro and in vivo studies. 2nd of Experts in Stone Disease (ESD), 2014.12.10-13, Cape Town, South Africa

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

- ・ 岡田 淳志 (OKADA ATSUHI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号： 70444966

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

- ・ 郡 健二郎 (KOHRI KENJIRO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・学長
研究者番号： 30122047
- ・ 戸澤 啓一 (TOZAWA KEIICHI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号： 40264733
- ・ 安井 孝周 (YASUI TAKAHIRO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号： 40326153

- ・ 濱本 周造 (HAMAMOTO SHUZO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号： 80551267
- ・ 広瀬 真仁 (HIROSE MASAHIRO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号： 70529172
- ・ 新美 和寛 (NIIMI KAZUHIRO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号： 70551274
- ・ 田口 和己 (TAGUCHI KAZUMI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号： 00595184
- ・ 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