

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462524

研究課題名(和文) NF- κ B活性化阻害剤を用いた尿路結石抑制機序の解明と臨床応用研究課題名(英文) Prevention of urolithiasis using anti-NF- κ B drugs

研究代表者

戸澤 啓一 (Tozawa, Keiichi)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40264733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：クルクミンによる結石形成の抑制効果をob/obマウスとwild typeを用いて調べた。wild type および ob/obマウスに対し50mg/kgグリオキシル酸(以下GOX) を6日間連日腹腔内投与し、結石形成、形態の確認を偏光顕微鏡、シュウ酸カルシウム結石染色(Pizzolato染色)で観察した。さらに両群に0.2%のクルクミンを添加した食餌を与えた群でも同様の検討を行った。クルクミン投与により、酸化ストレスの抑制、NF- κ B (p65)の尿細管での核内移行の抑制、アディポネクチンの発現増強、細胞傷害の軽減を認め、これらが結晶沈着抑制のメカニズムに関与する因子と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Kidney stone formation has been recognized as a metabolic syndrome (MetS)-related disease. The aims of the present study were to elucidate a possible mechanism of kidney stone formation under MetS conditions by using MetS mouse model and to assess the effectiveness of curcumin treatment for the prevention of kidney stone. Wild-type (+/+) and ob/ob mice (having a disorder in which to produce leptin) were administered daily doses of 50 mg/kg glyoxylate (GOx) for 6 days. To prevent kidney stone formation, exogenous curcumin treatment (2%) was administered daily. At day 3, 7 and 14, their kidneys were extracted. Curcumin inhibited NF- κ B activation, oxidative stress and CaOx deposition in renal tubular cells. this study showed that curcumin treatment prevented kidney stone formation by inhibition of NF- κ B activation, inflammation and apoptosis.

研究分野：尿路結石症

キーワード：尿路結石 メタボリックシンドローム 酸化ストレス NF- κ B クルクミン

1. 研究開始当初の背景

尿路結石は先進国において増加傾向にあり、今や約 10%もの発生となり、また再発率は約 40%と高いことからその成因の究明と再発予防の開発は、世界的な緊急課題になっている。私達は尿路結石マトリックス成分の 1 つとして OPN を分子生物学的手法により同定した。また、結石形成時には腎遠位尿細管細胞で OPN の発現が増えることを見いだした。さらに、腎尿細管培養細胞は尿酸 Ca 結晶との結合が強く、細胞内の OPN の発現を抑制すると結晶との結合が低下することを報告した。また、以前より、炎症により誘導される多くのサイトカイン、接着分子が尿路結石のマトリックス蛋白として重要な役割を果たしていることを確認している。

尿路結石は生活習慣病の一つであり、その発症機序、炎症との関連、OPN の関与など、動脈硬化症と多くの共通点をもつ。 心筋梗塞や動脈硬化は、病変部位でのサイトカイン (インターロイキン 1,6,8 など) や接着因子 (VCAM, ICAM, ELAN など) の発現亢進により、炎症性疾患であるとする捉え方が最近主流となってきている。これらサイトカインや接着因子の発現調節は、主に NF- κ B と呼ばれる転写因子によってかなりの部分が行われている。従って、転写因子 NF- κ B をターゲットとする創薬は、炎症性疾患一般の新規治療薬となる可能性がある。また、NF- κ B はレドックス (酸化・還元) 制御を調節することも報告されている。酸化ストレスは生体に対する障害作用を有しており、内皮細胞においては酸化 LDL がアポトーシスを誘導することが知られている。

これまで私たちは、尿路結石の成因を動脈硬化症との類似点、特に NF- κ B との関連から解明しようと研究を重ねてきた。その結果、NF- κ B により誘導される多くの蛋白 (OPN、MCP-1 等) が炎症を惹起し、マクロファージが誘導され、結石関連蛋白を貪食した後、泡沫化し、シュウ酸カルシウム等と結合して結石の核となることを証明してきた。さらにわれわれは、腎尿細管細胞で、酸化ストレスやシュウ酸刺激が NF- κ B を活性化することを見いだした。最近では、尿路結石形成時に、マクロファージが誘導され、M1 マクロファージと M2 マクロファージではその作用に相違があること、アポトーシスに陥った尿細管細胞のミトコンドリアが崩壊して結石原基となることを電顕で確認している。最終的に、種々の刺激によりマクロファージを中心とした炎症反応が連鎖的に起こり、結石形成に

つながると考えられる。

尿路結石の形成に重要な炎症、アポトーシス、マクロファージ誘導、結石関連蛋白の発現はほとんどが NF- κ B の活性化が基点となっている。したがって、NF- κ B の活性化を阻害することは結石予防の理にかなっていると考える。

2. 研究の目的

これまで、私たちは腎尿細管細胞において、シュウ酸刺激、酸化ストレスが動脈硬化症と同様に、NF- κ B によるシグナル伝達経路を活性化させることを見いだした。これに引き続いて、炎症性サイトカイン、結石関連蛋白である OPN や MCP-1 の発現が誘導され、結石形成が促進されることを発見した。また、NF- κ B の活性化がアポトーシスを誘導し、ミトコンドリアの崩壊が結石原基となることも証明した。本研究では、これらの成果をふまえて、抗酸化作用を有する NF- κ B 阻害剤による尿路結石の再発予防効果を調べ、臨床応用の実現を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NF- κ B 活性化阻害剤のシュウ酸刺激を介した経路への効果の検討

動脈硬化症の発症、病態進展において近年、注目されている NF- κ B シグナル伝達系キープロタン ; I- κ B, TRAF6, JUNK, c-Jun の発現をシュウ酸、COM 結晶、NO、炎症性サイトカインなどで刺激した腎尿細管細胞 (MDCK, NRK-52E) に NF- κ B 活性化阻害剤 (Curcumin, NAC) 添加後、抽出した蛋白で Western Blotting を行い検討した。さらに、p65 の細胞内局在、発現量をそれぞれの特異抗体を用いた免疫組織染色により明らかにした。

(2) NF- κ B 活性化阻害剤による結石関連物質の尿中排泄量の変化

ヒトが摂取可能な抗酸化作用を持つ NF- κ B 活性化阻害剤であり、さらに多量のフェノール系化合物を含んでいるルイボス茶を 10 名のボランティアに 1 ヶ月間経口摂取してもらい、24 時間畜尿による尿中シュウ酸、クエン酸、OPN、カルシウム、リン、マグネシウム測定を行った。さらに、投与前、投与 7 日毎に腎機能、肝機能を採血で測定した。

(3) メタボリックシンドローム (MetS) モデルマウスでの検討

これまで、われわれは、ob/ob マウス (B6.V-Lep^{ob}/J) では Wild type に比べ、より

結石形成が促進されることを報告した。これにはアディポサイトカインであるアディポネクチンが強く関与していることがわかっている。クルクミンによる結石形成の抑制効果を ob/ob マウスと wild type を用いて調べた。(A) wild type および (B) ob/ob マウスに対し 25、50mg/kg グリオキシル酸(以下 GOX) を 6 日間連日腹腔内投与(各 3 匹ずつ計 24 匹)し、結石形成、形態の確認を偏光顕微鏡、シュウ酸カルシウム結石染色 (Pizzolato 染色) で観察した。さらに両群に 0.2% のクルクミンを添加した食餌を与えた (C) (D) 群でも同様の検討を行った。3、7、14 日投与後に採血、採尿を行い安楽死させ腎臓を摘出した。尿中、血中パラメーターの測定を行い、腎尿管石灰化については偏光顕微鏡下に結晶の割合をパラメーター化した。SOD と MDA の免疫染色を行い、酸化ストレスと細胞傷害について評価を行った。さらに、NF- κ B (p65) の尿管での核内移行の有無を免疫組織染色で確認し、摘出腎におけるアディポサイトカイン(アディポネクチン、MCP-1、PAI-1 等) や酸化ストレス (SOD, MDA, 8-OHdG) の発現変化を免疫染色、PCR、Western blotting にて観察した。

4. 研究成果

(1) 腎尿管細胞において、シュウ酸 0.5 ml 刺激後 1 - 2 時間にかけて I- κ B のリン酸化および p65 の核移行が確認され、NF- κ B の活性化が証明された。これに引き続いてオステオポンチンの発現が増強した。このシュウ酸による NF- κ B の活性化は NAC 5mM 添加により抑制され、同時にオステオポンチンの発現も抑制された。シュウ酸刺激は NF- κ B の活性化を通じて細胞障害、炎症反応を介してオステオポンチンの発現を促進していた。抗酸化剤でもある NAC は NF- κ B の活性化を阻害することで炎症性サイトカインの発現、アポトーシス、オステオポンチンの発現いずれも抑制し、尿路結石形成の予防に有用な薬剤となりうると思われた。また、オステオポンチンの発現のみならず、シュウ酸刺激で誘導される腎でのマクロファージ、尿管での結晶形成も NAC により抑制されることが結石モデルマウスを用いた実験で示された。

(2) 血液・尿中のカルシウム濃度および総排泄量はルイボス茶飲用により、有意に低下した。さらにシュウ酸排泄量も有意に低下した。血液中の酸化反応物質 (TBARS) は有意に増加し、尿中では減少傾向を認めた。シュウ

酸化する結石リスクインデックスは、減少傾向であった。リン酸カルシウム結石リスクインデックスは、有意に低下した。以上の結果からルイボス茶が尿路結石抑制効果を持っていることが示された。

(3) (A) 群に比較して (B) 群では有意にシュウ酸カルシウム結晶の沈着が多かった。(C) (D) 群では、尿管へのシュウ酸カルシウム結晶沈着の有意な抑制効果が認められた。クルクミン投与により、酸化ストレスの抑制、NF- κ B (p65) の尿管での核内移行の抑制、アディポネクチンの発現増強、細胞傷害の軽減を認め、これらが結晶沈着抑制のメカニズムに関与する因子と考えられた。

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 8 件)

1. Taguchi K, Okada A, Hamamoto S, Iwatsuki S, Naiki T, Ando R, Mizuno K, Tozawa K, Kohri K, Yasui T : Proinflammatory and Metabolic Changes Facilitate Renal Crystal Deposition in an Obese Mouse Model of Metabolic Syndrome. J Urol. 194:1787-96, 2015. doi: 10.1016/j.juro.2015.07.083. 査読有
2. 戸澤 啓一、岡田 淳志、安井 孝周 : 尿路結石に用いる薬。泌尿器ケア、20 : 54-9, 2015. 査読無
3. 田口 和己、戸澤 啓一、安井 孝周 : 4. 尿路結石症 尿路結石。臨床泌尿器科、69(4):163-6(増刊号), 2015. 査読無
4. Ichikawa J, Okada A, Taguchi K, Fujii Y, Zuo L, 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. 査読有
5. Zuo L, Tozawa K, Okada A, Yasui T, Taguchi K, Ito Y, Hirose Y, Fujii Y, Niimi K, Hamamoto S, Ando R, Itoh Y, Zou J, Kohri K: A Paracrine Mechanism

- Involving Renal Tubular Cells, Adipocytes and Macrophages Promotes Kidney Stone Formation in a Simulated Metabolic Syndrome Environment. *J Urol.* 191:1906-12, 2014. doi: 10.1016/j.juro.2014.01.013. 査読有
6. 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. 査読有
 7. 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* 22;8:e61343, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0061343. 査読有
 8. Yasui T, Okada A, Hamamoto S, Hirose M, Ando R, Kubota Y, Tozawa K, Hayashi Y, Gao B, Suzuki S, Kohri K: The association between the incidence of urolithiasis and nutrition based on Japanese National Health and Nutrition Surveys. *Urolithiasis* 41:217-24, 2013. doi: 10.1007/s00240-013-0567-6. 査読有
- [学会発表](計 7 件)
1. 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、瀨本 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、長良川国際会議場 他（岐阜県岐阜市）
 2. 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）
 3. 田口 和己、海野 怜、瀨本 周造、安藤 亮介、金本 一洋、岡田 淳志、安井 孝周、藤田 圭治、戸澤 啓一、郡 健二郎：シュウ酸カルシウム結石の発生母地「Randall's Plaque」の制御因子同定による尿路結石分子標的治療の開発。第 103 回日本泌尿器科学会総会、2015.4.18-21、石川県立音楽堂 他（石川県金沢市）
 4. Niimi Kazuhiro, Taguchi Kazumi, Hirose Yasuhiko, Hirose Masahito, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Okada Atsushi, Yasui Takahiro, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Development of a new biomarker and treatment strategy for kidney stone disease targeting mitochondrial cyclophilin D activity. American Urological Association Annual Meeting 2014, 2014.5.16-21, Orlando (USA)
 5. Hirose Yasuhiko, Taguchi Kazumi, Fujii Yasuhiro, Niimi Kazuhiro, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Hirose Masahito, Okada Atsushi, Kubota Yasue, Itoh Yasunori, Yasui Takahiro, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Oxygen nano-bubble water exerts inhibitory effects on kidney stone formation by inhibiting renal tubular cell injury. American Urological Association Annual Meeting 2014, 2014.5.16-21, Orlando (USA)
 6. 藤井 泰普、岡田 淳志、田口 和己、廣瀬 泰彦、瀨本 周造、安藤 亮介、梅本 幸裕、安井 孝周、戸澤 啓一、郡 健二郎：メタボリックシンドローム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 102 回日本泌尿器科学会総会、2014.4.24-27、神戸国際会議場 他（兵庫県神戸市）
 7. Taguchi Kazumi, Okada Atsushi, Yasui Takahiro, Iwatsuki Shoichiro, Hamakawa Takashi, Hirose Yasuhiko, Kobayashi Takahiro, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: PPAR- / agonist have different effects on renal crystal formation in hyperoxaluric animal models. 29th

Annual EAU Congress, 2014.4.11-15,
Stockholm (Sweden)

〔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

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

(2)研究分担者

郡 健二郎 (KOHRI Kenjiro)

名古屋市立大学・学長

研究者番号：30122047

林 祐太郎 (HAYASHI Yutaro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40238134

廣瀬 泰彦 (HIROSE Yasuhiko)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：60381894

岡田 淳志 (OKADA Atsushi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：70444966

(3)連携研究者

なし