

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10626

研究課題名(和文) 遺伝因子・環境因子両面からの尿路結石症予防法の確立に向けた総括的研究

研究課題名(英文) A comprehensive study of the establishment of urolithiasis prophylaxis from both genetic factors and environmental factors

研究代表者

伊藤 恭典 (Ito, Yasunori)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：70295608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：尿路結石はメタボリックシンドロームの発症機序と類似していることを報告してきた。そこで本研究ではそれらの研究を推し進め、尿路結石症予防法の確立をめざし遺伝因子と環境因子の両面から研究を行った。

1. 遺伝因子からのアプローチ：マウスの亜系統間における結石形成の検討からNnt geneが結石に関連する因子の一つであることを見出した。2. 環境因子からのアプローチ：PPAR γ アゴニストを結石モデルラットに投与した。adipocytokineの発現変化を伴って結石形成抑制効果をもつことを報告した。メタボリックシンドロームでは酸化ストレスが亢進しており、結石形成しやすいことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have reported that urolithiasis is similar to the onset mechanism of metabolic syndrome. Therefore, in this research, we pushed through these studies, and aimed at establishing a method for preventing urolithiasis prevention, we conducted research from genetic factors and environmental factors. 1. Approach from genetic factors: We have found that nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) gene is one of the factors related to the stone formation from the study between subgenera of the mouse. 2. Approach from environmental factors: PPAR-gamma agonist (thiazolidinedione) was administered to stone model rats. It has been reported that it has an inhibitory effect on the formation of calculus accompanied by an altered expression of adipocytokine. The metabolic syndrome forms urinary stone via oxidative stress elevation.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：尿路結石 メタボリックシンドローム 肥満 予防 PPAR

1. 研究開始当初の背景

わが国における尿路結石の発生頻度は、第二次世界大戦後急増しており、その原因は高度経済成長に伴う食生活の欧米化やライフスタイルの変化と考えられている。特に、上部尿路結石の発生頻度は、2005年の尿路結石症全国疫学調査では年間男性192人、女性79人(対人口10万比)と1965年から倍増し、生涯罹患率は男性15.1%、女性6.8%まで増加するに至っている(文献1)。最近、内臓脂肪蓄積によるメタボリックシンドロームが注目され、あらためて生活習慣病の予防意識が高まっている。このなかで臨床的に重要な点は、動脈硬化性疾患による心血管合併症への対策である。

尿路結石は動脈硬化と疫学的にも形成機序でも類似している。例えば、好発年齢は中高年男性と閉経後女性で、欧米化食生活の関与、カルシウムを含む石灰化成分、形成機序としてMCP-1、M-CSF、TGF- β 、TNF- α 、CD44などのサイトカインの発現、マクロファージの遊走、カルシウムの他に結石マトリクスであるオステオポンチン(OPN)の存在などが両者の共通点としてあげられる(文献2)。私たちは、腹部大動脈の石灰化をスコア化し、健常者と比較したところ、若年男性と高齢女性で結石患者に大動脈石灰化が多くみられた。

従来までの尿路結石の研究は、主に無機成分の観点から行われてきたが、私たちは遺伝子および蛋白の見地から行うことにより、結石形成機序を細胞レベルで解明してきた。尿路結石マトリクス成分のひとつとしてOPNを同定し、結石形成の分子機構を解明してきた。その結果、従来までの「無機物質が過飽和になると尿路結石ができる」という概念を変えるとともに、OPNをはじめとする結石関連蛋白を遺伝子レベルで扱うようになった。従来までの結石形成モデル動物はラットのみであったが、結石形成モデルマウスの確立に成功した。このことから遺伝子組み換えマウスと比較することが可能となり、飛躍的に研究が進んだ。

これらの研究成果を踏まえ私たちは、「遺伝因子・環境因子両面からの尿路結石症予防法の確立に向けた総括的研究」を行う着想に到った。

2. 研究の目的

私たちは、尿路結石はメタボリックシンドロームの発症機序と類似していることを報告してきた。そこで本研究ではそれらの研究を推し進め、尿路結石症予防法の確立をめざし遺伝因子と環境因子の両面から基礎的な横断的研究を行うことを目的とした。遺伝因子では、尿路結石に関連する遺伝因子の同定とその応用を目指した。環境因子では、メタボリックシンドロームに関与するアディポサイトカインとストレス感受性シグナルの

結石形成における役割を解明し、予防法への応用を目指した。

3. 研究の方法

(1) 遺伝因子からのアプローチ

私たちはマウスにシュウ酸前駆物質を腹腔内投与することにより、結石モデルマウスを作成することに成功したが、この手法を確立する過程において、結石形成量に差を認めた。用いた近交系はC57BL/6(B6)マウスであるが、この近交系にはC57BL/6J(B6J)マウスとC57BL/6N(B6N)マウスの亜系統が存在し、遺伝学的に差がみられる。このマウス亜系統に着目し、新たな尿路結石関連遺伝子の同定を行った。8週齢雄のB6JマウスとB6Nマウス(各N=15)を用い、尿路結石モデルマウスの手法に準じてグリオキシリ酸80mg/kgを連日腹腔内投与した。投与開始後0、6、12日目に腎を採取し、結石形成量をPizzolate染色および偏光顕微鏡にて観察し比較した。マウス亜系統間において、遺伝学的に差がある6遺伝子(Naalad12、Aplp2、Lims1、Fgf14、Snap29、Nnt)の腎における発現量を、定量PCRを用いて比較した。腎における活性酸素種(ROS)の活性を、Carbonyl Protein Immunostaining kitを用いて比較検討した。酸化ストレスの変化は、SOD-1、MDAをマーカーとして用い、免疫染色やWestern blotting法にて比較した。

(2) 環境因子からのアプローチ

摂食中枢を調整するLeptin遺伝子の変異により過食となったMetSモデルマウス(Ob/Obマウス)では、炎症性アディポサイトカインの発現と共に腎結石形成が著名に増加したことが観察され、肥満環境における炎症性アディポサイトカインの発現が腎結石形成を促進することが示唆された。

高脂肪食による結石形成についての影響の検討

6週令のラットを用いて、シュウ酸前駆物質であるエチレングリコール(EG)の自由飲水に8週間の高脂肪食の投与を追加し、結石形成についてその高脂肪食の影響を検討した。肥満モデルマウス(Ob/Obマウス)においても、高脂肪食の影響を検討した。

結石形成については、偏光顕微鏡とカルシウム染色で、発現遺伝子については免疫染色で、腎尿細管細胞の微細構造については透過型電子顕微鏡を用いて観察し、検討した。

ペルオキシゾーム増殖誘導受容体(PPAR)による結石形成予防効果の検討

ペルオキシゾーム増殖誘導受容体(PPAR)は、核内受容体の一種で、炭水化物、脂質、タンパク質等の細胞内代謝と細胞の分化に関与する遺伝子の発現を制御している。

の3つのサブファミリーが知られているが、PPARは脂肪酸およびアセチルCoAを介して脂質代謝を調整することから、その作用薬は高脂血症とくに高トリグリセリド血

症の治療に使われる。また PPAR は組織のインスリン感受性を亢進させる受容体として糖尿病治療の標的となっている他、免疫過程への関与および抗酸化ストレス作用による細胞保護機能を有する。これら PPAR 作動薬の抗炎症・酸化作用に着目し、PPAR 作動薬（フェノフィブラート）・PPAR 作動薬（ピオグリタゾン）を腎結石モデルラットに投与する研究を行った。

アディポサイトカインによる結石形成予防効果の検討

脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインのうち、抗炎症性のものでアディポネクチン（APN）がよく知られており、APN の作用による動脈硬化の改善の基礎研究が報告されている。前述の Ob/Ob マウスに APN を投与することで腎結石形成の抑制高かを検討した。

4. 研究成果

(1) 遺伝因子からのアプローチ

シュウ酸カルシウム結石形成量は、B6J マウスが B6N マウスに比べて有意に多かった。腎における遺伝子発現量は、Nnt のみ B6J マウスにおいて有意に発現量が低下していた。

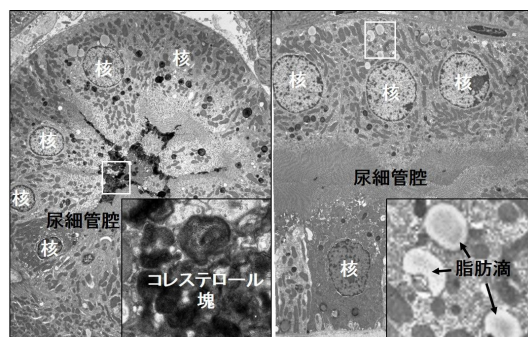
腎における ROS 活性は、B6J にやや高い傾向を認めた。腎における SOD-1 および MDA の発現は、尿細管上皮細胞に認められ、B6J と B6N の間に有意な差を認めなかった。B6J にて発現低下が認められた Nnt はヒトにも存在し、ミトコンドリア内の細胞内 ROS を減少させる。Nnt の発現低下により ROS が増加し、尿路結石形成が促進されることを予測し、本研究からは同傾向を認めた。さらなる研究により、Nnt による酸化ストレス抑制が、尿路結石形成を抑制する機構が解明されるものと期待できる。

(2) 環境因子からのアプローチ

高脂肪食による結石形成についての影響の検討

6 週令のラットを用いて、シュウ酸前駆物質であるエチレングリコール（EG）の自由飲水に 8 週間の高脂肪食の投与を合わせることで、腎結石形成が著明に増加することを確認した。また Ob/Ob マウスにおいても、高脂肪食の投与と EG の自由飲水によって著明な腎結石形成が観察された（**図 1**）。さらに透過型電子顕微鏡における超微細構造の観察において、高脂肪食を投与した Ob/Ob マウスでは腎尿細管上皮細胞内に脂肪滴と尿細管腔内にコレステロール塊が沈着していることが分かり、高脂肪環境において、これらコレステロールの沈着が結石形成を助長している可能性を報告した。

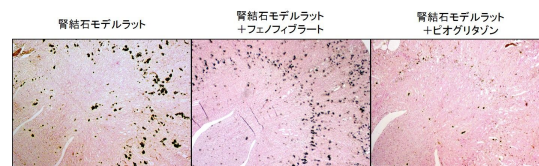
【**図 1**】 高脂肪投与 Ob/Ob マウスの腎尿細管上皮細胞：尿細管腔内に沈着したコレステロール塊と、細胞内に存在する脂肪滴が見られる



ペルオキシソーム増殖誘導受容体（PPAR）による結石形成予防効果の検討

ピオグリタゾンを投与した群では、腎結石形成量が著明に減少（**図 2**）し、結石関連遺伝子および炎症性アディポサイトカインの発現が低下した。

【**図 2**】 PPAR 作動薬ラットの腎結石形成：シュウ酸カルシウム染色により、腎皮髄境界部を中心とした結石沈着が観察され、PPAR 作動薬（ピオグリタゾン）投与群では腎結石形成量が著明に減少した。



アディポサイトカインによる結石形成予防効果の検討

Ob/Ob マウスに APN を投与することで腎結石形成が抑制されることを明らかにした 18。APN の投与により、結石関連遺伝子のみならず炎症性アディポサイトカイン、接着因子などの発現も抑制されており、脂肪細胞の制御による治療効果が考えられている。

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 4 件)

Usami M, Okada A, Taguchi K, Hamamoto S, Kohri K, Yasui T. Genetic differences in C57BL/6 mouse substrains affect kidney crystal deposition. Urolithiasis. 2018 Jan 23. doi: 10.1007/s00240-018-1040-3. [Epub ahead of print]

Yasui T, Okada A, Hamamoto S, Ando R, Taguchi K, Tozawa K, Kohri K. Pathophysiology-based treatment of urolithiasis. Int J Urol. 2017 Jan;24(1):32-38.

Taguchi K, Okada A, Hamamoto S, Unno R, Kobayashi T, Ando R, Tozawa K, Gao B, Kohri K, Yasui T. Differential Roles of

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- and Receptor- on Renal Crystal Formation in Hyperoxaluric Rodents. PPAR Res. 2016;2016:9605890.

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. 2015 Dec;194(6):1787-96.

〔学会発表〕(計 19 件)

(シンポジウム 食品・栄養素と泌尿器疾患の予防) 安藤亮介、鈴木貞夫、岡田淳志、伊藤恭典、戸澤啓一、安井孝周：食品・栄養素から考える尿路結石の予防。第 26 回日本腎泌尿器疾患予防医学研究会、2017 年

安藤亮介、鈴木貞夫、岡田淳志、伊藤恭典、戸澤啓一、安井孝周：食品・栄養素から考える尿路結石の予防。2017.7.14 第 26 回日本腎泌尿器疾患予防医学研究会、2017 年

宇佐美 雅之、海野 怜、田口 和己、廣瀬 泰彦、瀧本 周造、安藤 亮介、岡田淳志、伊藤恭典、戸澤啓一、郡健二郎、安井孝周：ルイボス茶による抗酸化作用および尿路結石に与える影響。第 105 回日本泌尿器科学会総会、2017 年

藤井 泰普、田口 和己、岡田淳志、杉野 輝明、海野 怜、宇佐美 雅之、瀧本 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 年

Itoh Yasunori, Taguchi Kazumi, Fujii Yasuhiro, Hirose Yasuhiko, Usami Masayuki, Hamamoto Shuzo, Kobayashi Takahiro, Hirose Masahito, Okada Atsushi, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Silodosin, the selective alpha 1A adrenoceptor antagonist, facilitates expulsion of size 5-10 mm distal ureteral. 13th International Symposium on Urolithiasis, 2016 年

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 年

Okada Atsushi, Unno Rei, Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Zuo Li, Gao Bing, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Efficacy of ESWL training using human body-typed stone-targeting phantoms. 13th International Symposium on Urolithiasis, 2016 年

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 年

Ito Yasuhiko, Sugino Teruaki, Niimi Kazuhiro, Hirose Masahito, Itoh Yasunori, Okada Atsushi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Role of mitochondrial permeability transition in kidney stone formation. 13th International Symposium on Urolithiasis, 2016 年

Kobayashi Takahiro, Okada Atsushi, Ando Ryosuke, Hirose Masahito, Itoh Yasunori, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Recovery from nephrotoxicity in rats administered both melamine and cyanuric acid. 13th International Symposium on Urolithiasis, 2016 年

海野 怜、田口和己、瀧本周造、杉野輝明、安藤亮介、岡田淳志、伊藤恭典、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。日本尿路結石症学会第 26 回学術集会。2016 年

Itoh Yasunori, Okada Atsushi, Taguchi Kazumi, Hirose Yasuhiko, Fujii Yasuhiro, Kobayashi Takahiro, Usami Masayuki, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Tozawa Keiichi, Sasaki Shoichi, Yasui Takahiro, Kohri Kenjiro: Administration of the selective alpha 1A adrenoceptor antagonist silodosin facilitates expulsion of size 5 - 10 mm distal ureteral stones, as compared to control. 2016 (111th) Annual Meeting of American Urological Association. 2016 年

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. 2016 (111th) Annual Meeting of American Urological

Association (San Diego, USA) 2016 年

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. 2016 (111th) Annual Meeting of American Urological Association (San Diego, USA) 2016 年

Taguchi Kazumi, Okada Atsushi, Hamamoto Shuzo, Unno Rei, Kamisawa Hideyuki, Naiki Taku, Ando Ryosuke, Umemoto Yukihiro, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: The role of M1/M2 macrophages for CaOx stone and Randall 's plaque formation. The 31th Annual Congress of the European Association of Urology, 2016 年

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 (旭川市) 2015 年

Kazumi Taguchi, Rei Unno, Yasuhiro Hirose, Shuzo Hamamoto, Takahiro Kobayashi, Ryosuke Ando, Atsushi Okada, Yasunori Itoh, Takahiro Yasui, Keiichi Tozawa, Yutaro Hayashi, Kenjiro Kohri: PPAR- / agonists have different effects on renal crystal formation in hyperoxaluric animal models. 2015 (110th) Annual Meeting of American Urological Association (New Orleans, Louisiana, USA) 2015 年

Yasunori Itoh, Atsushi Okada, Kazumi Taguchi, Yasuhiko Hirose, Yasuhiro Fujii, Takahiro Kobayashi, Masayuki Usami, Shuzo Hamamoto, Masahito Hirose, Takahiro Yasui, Keiichi Tozawa, Shoichi Sasaki, Yutaro Hayashi, Kenjiro Kohri: Administration of the selective alpha 1A adrenoceptor antagonist silodosin facilitates expulsion of size 5 - 10 mm distal ureteral stones, as compared to control. 2015 (110th) Annual Meeting of American Urological Association (New Orleans, Louisiana, USA) 2015 年

安藤亮介、永谷照男、鈴木貞夫、海野怜、田口和己、高橋英勝、河合信、岡田淳志、安

井孝周、伊藤恭典、戸澤啓一、郡健二郎: 慢性腎臓病の発症予防をめざした腎結石と生活習慣病との交互作用の検討。第 103 回日本泌尿器科学会総会 (金沢市) 2015 年

〔図書〕(計 2 件)

伊藤恭典、安井孝周: 尿路結石症。ガイドライン外来診療 2016 pp 307-314 (発行: 2016 年 3 月 15 日 第 16 版発行、発行: 日経メディカル開発、発売: 日経 BP マーケティング)

伊藤恭典、安井孝周: 泌尿器疾患 尿路結石症。今日の診療のために ガイドライン外来診療 2017、315-322、2017 発行: 2017 年 2 月 17 日 第 17 版、日経メディカル開発 [その他]

ホームページ等:

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/uro.dir/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤恭典 (Itoh Yasunori)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号: 7 0 2 9 5 6 0 8

(2) 研究分担者

郡健二郎 (Kohri Kenjiro)

名古屋市立大学・その他・学長

研究者番号: 3 0 1 2 2 0 4 7

戸澤啓一 (Tozawa Keiichi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 4 0 2 6 4 7 3 3

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: 4 0 3 2 6 1 5 3

岡田淳志 (Okada Atsushi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 7 0 4 4 4 9 5 6