

令和 4 年 4 月 14 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09174

研究課題名(和文) ベージュ細胞の抗メタボリックシンドローム効果に着目した尿路結石の新規予防薬の開発

研究課題名(英文) Development of a new preventive drug for urinary calculus focusing on the anti-metabolic syndrome effect of beige cells

研究代表者

遠藤 純央 (Endo, Sumio)

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：30646823

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)：まずは、C3H10t1/2細胞から分化させたベージュ細胞とマウス尿管上皮細胞の共培養実験を行った。共培養させた群で尿管上皮細胞へのCOM結晶付着量が少ない傾向にあった。また、共培養群では培養時間の経過とともに、尿管上皮細胞の炎症性サイトカインの発現が低下した。続いて、腎結石モデルマウスの手法を用いた実験を行った。3刺激薬を投与してベージュ細胞への分化誘導を行うと、Controlと比較して腎結石形成量が有意に減少した。また、腎における遺伝子発現を調べると、ベージュ細胞を分化誘導したマウスにおいては、炎症性サイトカインの発現が低下し、抗酸化ストレスマーカーの発現が亢進していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、抗メタボリックシンドローム作用を持つベージュ細胞は、腎の抗炎症・抗酸化ストレス作用をもたらし、腎結石形成を抑制する可能性が示された。この研究を進展させることで、メタボリックシンドロームの改善および尿路結石の予防という、双方向性の治療薬開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：First, we conducted a co-culture experiment of beige cells differentiated from C3H10t1/2 cells and mouse tubular epithelial cells. In the co-cultured group, the amount of COM crystals attached to tubular epithelial cells tended to be small. In the co-culture group, the expression of inflammatory cytokines in tubular epithelial cells decreased with the passage of culture time. Subsequently, an experiment using the method of a kidney stone model mouse was performed. When 3 stimulant was administered to induce differentiation into beige cells, the amount of renal stone formation was significantly reduced as compared with Control. Moreover, when the gene expression in the kidney was examined, the expression of inflammatory cytokines was decreased and the expression of antioxidant stress markers was enhanced in the mice in which beige cells were induced to differentiate.

研究分野：泌尿器科

キーワード：腎結石 メタボリックシンドローム 3刺激薬 ベージュ細胞

## 1. 研究開始当初の背景

尿路結石の成分は、90%以上を占める無機成分と数%の有機成分(結石マトリックス)から構成される。これまで、多量の飲水と尿中無機物質の制御による予防法が実施されてきた。しかし、尿路結石は依然として増加の一途を辿っており、無機物質のみの観点から尿路結石予防治療を行うには限界があると私たちは考えた。

そこで、「尿路結石形成に関わる遺伝因子」の存在を仮説し、尿路結石の結石マトリックスとしてオステオポンチン(OPN)を同定した<sup>1)</sup>。また、尿路結石に家族発生が多い点や、動脈硬化性疾患、MetS、骨代謝疾患との疫学的な相関が高い点に着目した。これらを踏まえ、遺伝子改変動物・細胞を用いた一連の基礎研究によって、OPNが結石の促進因子であり、動脈硬化の形成時においても発現することを報告してきた<sup>2)</sup>。さらに、以下の2つの基礎研究を通して、MetSは尿路結石形成を促進することを証明した。

### ・MetSモデルマウス(ob/ob)における尿路結石形成<sup>3)</sup>

食欲抑制遺伝子レプチンを欠損することによりMetSを発症するob/obマウスでは、正常マウス(wild type)と比べて結石形成量が多かった。これらマウス腎の遺伝子発現についてマイクロアレイ解析を行った結果、ob/obでは炎症・接着因子の発現亢進を認めた。

### ・MetS環境共培養モデルを用いたパラクライン因子の検討<sup>4)</sup>

腎尿細管細胞を脂肪細胞、マクロファージと共培養させたところ、尿路結石の成分であるシュウ酸カルシウム結晶の細胞付着能が亢進した。さらに、IL-6、TNF、OPNなど、MetS関連因子の発現も亢進していた。これらの因子を介したパラクラインにより、尿路結石形成が促進されると考えられた。

脂肪細胞にはエネルギー貯蔵に関わる白色脂肪細胞と、エネルギー代謝に関わる褐色脂肪細胞が存在する。白色脂肪細胞は、肥大化に伴い全身性の炎症を引き起こしてMetSの主因になるとともに、尿路結石形成を促進する<sup>3)</sup>。また、全身性の炎症を引き起こす因子の一つとして、白色脂肪細胞から分泌される遊離脂肪酸が挙げられる。一方で褐色脂肪細胞は、特異的な熱産生タンパクUCP-1(uncoupling protein-1)を発現し、遊離脂肪酸やグルコースを消費してエネルギー代謝を行い、MetSを改善すると期待されている<sup>5)</sup>。近年、β3刺激薬によって白色脂肪細胞からベージュ細胞へ分化することが報告された。ベージュ細胞は褐色脂肪細胞同様に遊離脂肪酸などを消費してMetSを改善すると注目される。私たちは、ベージュ細胞への分化誘導が、遊離脂肪酸の消費を通して抗炎症作用を生み、尿路結石を予防するのではないかという学術的問いに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、脂肪細胞の分化と尿路結石形成の関係に着目し、ベージュ細胞への分化誘導がもたらす影響を調べるとともに、新たな尿路結石の予防法開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### 【研究1】尿細管細胞と脂肪細胞の共培養系を用いた褐色脂肪細胞の機能解析

ダブルチャンバーを用いてマウス腎尿細管上皮細胞(M-1)とベージュ細胞(C3H10t1/2細胞)の共培養を行なった(図1)。48時間共培養させ、M-1にシュウ酸カルシウム一水和物(COM)結晶を暴露させ、M-1への結晶付着量およびM-1の遺伝子発現を調べた。

図1. 脂肪細胞、マクロファージ、尿細管細胞の共培養



### 【研究2】結石モデルマウスにおけるベージュ細胞分化誘導による結石抑制効果

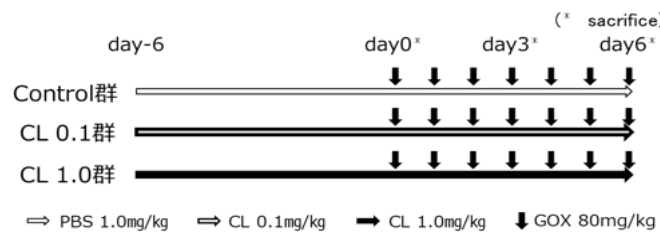
私たちは、シュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸(GOX)をマウスの腹腔内投与すること

で、尿路結石を生じさせることに世界で初めて成功した<sup>6)</sup>。この尿路結石モデルマウスにおいて、 $\beta 3$  刺激薬である CL316,243(CL)を投与してベージュ細胞への分化誘導を行い、腎における結石形成量、関連遺伝子の発現の変化について検討した。

#### 【対象と方法】

7 週齢雄の野生型マウス (C57BL/6 マウス) を用意した (図 2、各群 n=12)。PBS および CL を連日腹腔内投与し、投与 6 日目から GOX を並行して投与した。

図 2. 結石モデルマウスにおけるベージュ細胞への分化誘導

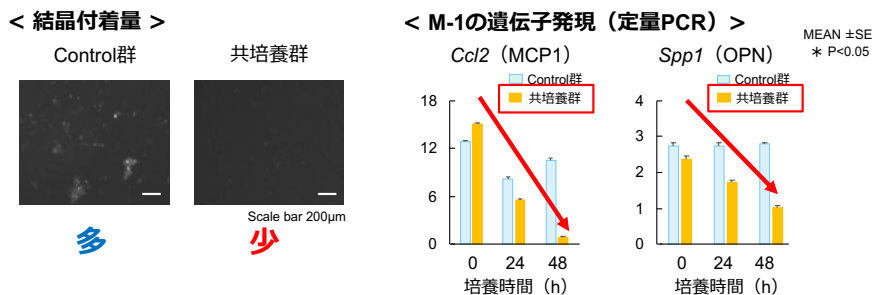


#### 4. 研究成果

##### 【研究 1】尿管細胞と脂肪細胞の共培養系を用いた褐色脂肪細胞の機能解析

結晶付着量は、共培養群において少ない傾向にあった。M-1 の遺伝子発現を見ると、抗炎症性サイトカインである *Ccl2* および *Spp1* の発現が共培養群では、培養時間の経過とともに低下していた(図 3)。

図 3. 結晶付着量と M-1 の遺伝子発現



##### 【研究 2】結石モデルマウスにおけるベージュ細胞分化誘導による結石抑制効果

24 時間生化学の結果では、尿量および尿生化学に差を認めなかった。

脂肪組織の形態を観察すると、day-6 では 3 群共に大型の脂肪滴を有していたが、day0・day6 では、CL の投与量に依存して脂肪滴の縮小化を認めた(図 4)。また、day6 における脂肪組織を電子顕微鏡で観察すると、CL1.0 群において、ミトコンドリア数の増加を認めていた。脂肪組織の遺伝子発現を定量 RT-PCR で調べると、ベージュ細胞に特異的な遺伝子 *Ucp-1* の発現は、CL の投与量依存性に上昇していた。また、CL1.0 群においては、抗炎症作用を持つ *Adipoq* の発現が上昇し、炎症作用性サイトカインである *Il6*、*Spp1* の発現が低下していた。脂肪組織における UCP1 の免疫染色を行うと、核と脂肪滴を除く細胞質が染色されていた。

図 4. 脂肪組織の形態

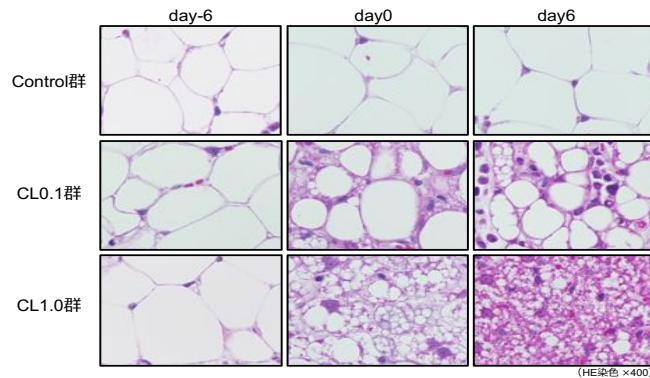
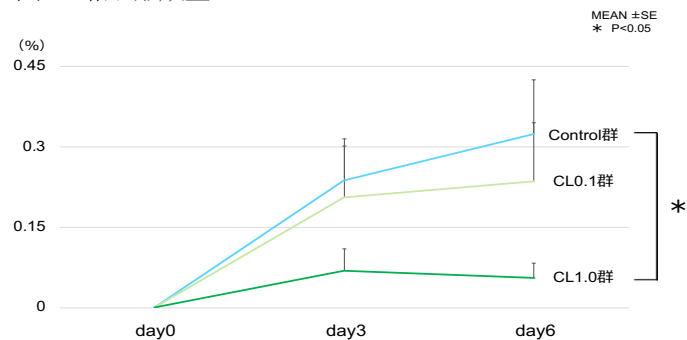


図 5. 結石形成量



腎における結石形成量を調べると、day6 において、CL1.0 群では Control 群と比較して優位に結石形成量が少なくなっていた(図 5)。また、腎の遺伝子発現を定量 RT-PCR で調べると、炎症作用性サイトカインである *Ccl2*、*Il6* の発現が低下し、抗酸化ストレス作用を持つ *Sod* の発現が上昇していた。

以上の結果から、脂肪細胞をベージュ細胞に分化させることで、腎における抗炎症・抗酸化ストレス作用が生まれ、結石形成が抑制されたと考えられた。

<参考文献>

- [1] Kohri K et al. J Biol Chem 268: 15180-4, 1993
- [2] Okada A et al. J Bone Miner Res 23: 1629-37, 2008
- [3] Fujii Y et al. PLoS One 22: 8; e61343, 2013
- [4] Zuo L et al. J Urol 191: 1906-12, 2014
- [5] Outllet V, et al. J Clin Invest. 2012
- [6] Okada A et al. Urol Res 35: 89-99, 2007

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉野 輝明、岡田 淳志、田口 和己、田中 勇太郎、海野 怜、瀧本 周造、遠藤 純央、安藤 亮介、最上 徹、郡 健二郎、山下均、安井 孝周
2. 発表標題 褐色脂肪細胞とベージュ脂肪細胞は炎症・酸化ストレスの制御を介して腎結石形成を抑制する。
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉野 輝明、岡田 淳志、田口 和己、田中 勇太郎、海野 怜、瀧本 周造、遠藤 純央、安藤 亮介、最上 徹、郡 健二郎、山下均、安井 孝周
2. 発表標題 褐色脂肪細胞とベージュ脂肪細胞は炎症・酸化ストレスの制御を介して腎結石形成を抑制する
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019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	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)	

6. 研究組織（つづき）

	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	濱本 周造  (Hamamoto Shuzo)  (80551267)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師    (23903)	
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)・講師    (23903)	
研究分担者	藤井 泰普  (Fujii Yasuhiro)  (30566229)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員    (23903)	
研究分担者	海野 怜  (Unno Rei)  (40755683)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員    (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