

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16744

研究課題名（和文）脂質異常症が尿路結石の形成に及ぼす影響

研究課題名（英文）Effect of dyslipidemia on urinary stone formation

研究代表者

井口 孝司（Iguchi, Takashi）

和歌山県立医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：30725578

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）：8週齢の野生型マウス(C57BL/6J)を用いてシュウ酸前駆物質である Glyoxylate 80mg/kg を6日間連続投与することで、尿路結石の形成を確認すると共に結石量を面積にて測定。これと平行して8週 齢のApoEKOマウスにも同様に6日間連続投与を行い、野生型マウスとの結石生成率の検討を 行ったところ、両群の結石生成率に差はないと いう結果であった。これを受けて、Glyoxylateの投与量を60mg/kg、100mg/kgに変更して投与したが、共に結石生成率に差は認められなかった。このことから8 週齢では野生型マウスとApoEKOマウスに大差がないことが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿路結石の生成については解明されていないが、メタボリック症候群との関連性は深い。今回、メタボリック症候群の代表的な病態である脂質代謝異常について脂質異常モデルマウス(ApoE遺伝子欠損(ApoEKO)マウス)を用いて尿路結石の生成をみたが、8週齢では野生型マウスとApoEKOマウスに大差がないことが確認された。このことにより、脂質異常のみの単体での病態で結石生成が行われているわけではなく、様々な病態が絡み合い結石生成に関与していることが示唆された。実臨床においても単発の因子のみを改善するのではなく、様々な因子を改善することが必要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Eight-week-old wild-type mice (C57BL/6J) were administered 80 mg/kg of oxalic acid precursor Glyoxylate continuously for 6 days to confirm the formation of urinary tract stones and to measure the amount of stones by area. . In parallel with this, 8-week-old ApoEKO mice were similarly administered for 6 consecutive days to examine the calculus formation rate compared to wild-type mice. was the result. In response to this, the dosage of Glyoxylate was changed to 60mg/kg and 100mg/kg, but no difference was observed in the calculus formation rate. From this, it was confirmed that there was no significant difference between wild-type mice and ApoEKO mice at 8 weeks of age.

研究分野：尿路結石

キーワード：尿路結石 メタボリック症候群 ApoE 結石モデルマウス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

食生活や生活様式の欧米化、人口構成の高齢化などに伴い、本邦における尿路結石症の生涯罹患率は男性 15.1%、女性 6.8%と上昇傾向にあり、医療経済を圧迫する社会問題となっている。現在では「尿路結石症はメタボリック症候群(MetS)の一病態である」と広く認識されており、当教室においてもこれまで MetS と尿路結石症の関係について臨床および基礎研究を行ってきた^{1, 2)}。しかし、尿路結石症においてもっとも重要なポイントのひとつである「再発予防」に関しては、未だに有効な予防法は、多量の飲水しかなく、5 年再発率は 40-50%と、この現代社会において依然高いままである。このような経緯から、研究代表者は MetS の様々な病態の一つ一つにおいて分子細胞生物学的観点から研究を行うことが、新たな尿路結石予防の確立のために必要な課題であると考えてきた。

MetS の代表的な病態である脂質異常症と尿路結石症の関係は 2005 年尿路結石全国疫学調査でも明らかにされており、当教室の根本により報告されている¹⁾。本研究者も自施設における尿路結石症患者を対象に脂質異常プロファイルと尿路結石の重症度を検討し、脂質異常が結石重症度に寄与していることを 2017 年日本泌尿器科総会で報告した。また、高脂肪食負荷されたラットや肥満モデルマウス、すなわち MetS モデルマウスに Glyoxylate を投与し尿路結石モデルマウスを作成することで炎症誘発サイトカインの産生亢進や腎結石形成量が有意に増加することことが報告されている^{3, 4)}。

一方、ApoEKO マウスは優秀な脂質異常モデルマウスとして様々な分野で研究に用いられており、腎においても炎症誘発サイトカインの産生が亢進し腎障害を引き起こすことは報告されている⁵⁾。また、降圧作用・臓器保護作用に期待されている ACE2 が腎組織における炎症誘発サイトカインの産生を抑制するということが報告されている⁵⁾。

本研究者はここに着目し、脂質異常症による腎組織での炎症誘発が尿路結石形成を亢進させると共に、ACE2 による抗炎症作用で尿路結石形成が抑制されるのではないかと、という仮説(図 2)を立て、ApoEKO マウスを用いて尿路結石モデルマウスを作成するという研究を立案するに至った。

図1. ApoE遺伝子欠損マウスを用いて研究する理由

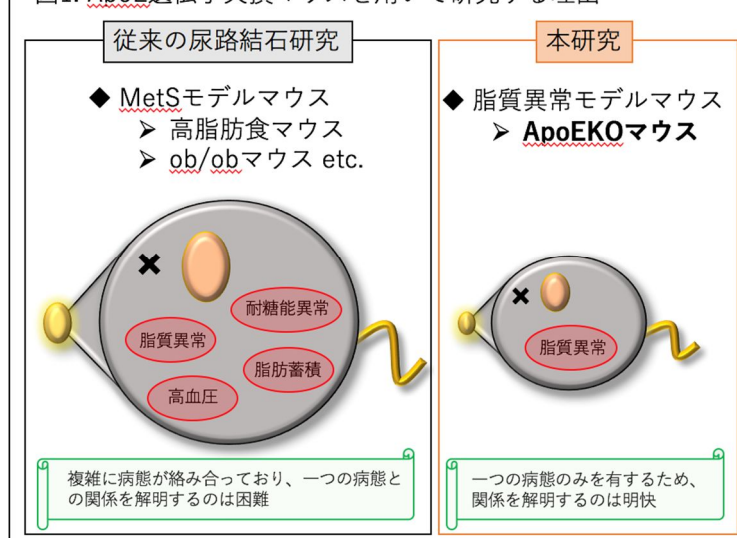


図2. 脂質異常症による腎組織での炎症誘発が尿路結石形成を亢進させる機序の仮説①
ACE2による抗炎症作用で尿路結石形成が抑制される機序の仮説②

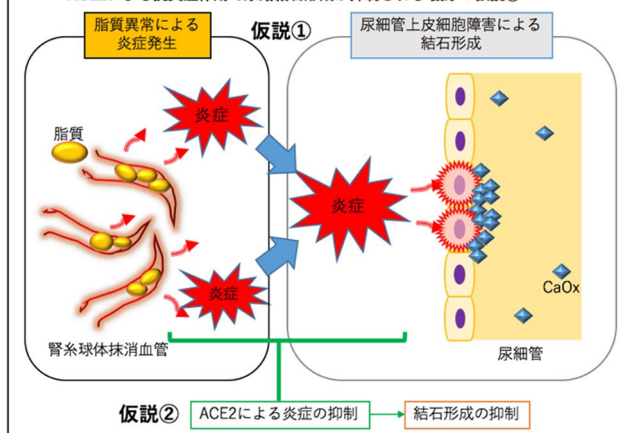
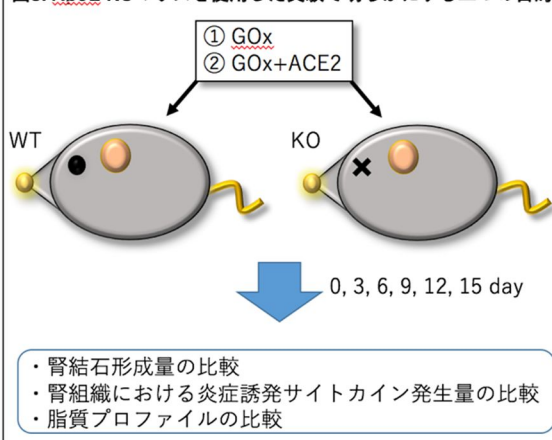


図3. ApoE KOマウスを使用した実験で明らかにする二つの目的



2. 研究の目的

高脂肪食ラットや ob/ob マウスのような MetS モデルマウスを用いることで MetS と尿路結石症の関係が研究され報告されている。しかし、MetS とは様々な病態の集まりであり、それぞれが複雑に絡み合っている。この病態一つ一つとの関係性を解明してこそ、尿路結石治療・予防に

意味があると考えられる。本研究では、尿路結石症の領域では用いられていない ApoEKO マウスを用いることで、MetS の一病態である脂質異常症と尿路結石症の関係を分子細胞生物学的に解明するという観点から、非常に特色のある研究になると考えられる(図 1)。

また、本研究が ApoEKO マウスを用いることで尿路結石症における脂質異常症の影響を解明する先駆けとなり、他の領域で研究されている最新の知見を尿路結石症予防に取り入れることができると考えている。それにより、分子細胞生物学的エビデンスに立脚した新規の尿路結石予防薬の開発につながる第一歩となると考えている。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウス (C57BL/6J) を用いた結石モデルの検討

尿路結石モデルマウスとして、8 週齢の野生型マウスにシュウ 酸前駆物質である Glyoxylate 80mg/kg を腹腔内投与するモデルが用いられている(Okada et al., J Bone Miner Res 25: 2701-2711, 2010)。今回、8 週齢、12 週齢、24 週齢に対して、Glyoxylate 投与後 6 日目での結石生成量について評価する。

(2) ApoE 遺伝子欠損マウス (ApoEKO マウス) を用いた結石モデルの検討

ApoE 遺伝子欠損による脂質異常が尿路結石の形成に及ぼす影響を検討するために、8 週齢、12 週齢、24 週齢の ApoEKO マウス、およびそのコントロールマウスに Glyoxylate 80mg/kg を 6 日間連日腹腔内投与し、結石生成量について評価する。

(3) 結石生成量評価

マウス腹腔内にペントバルビタールナトリウムを投与し、鎮静化したところで胸部を切開し PBS 溶液にて脱血。その後、4%パラホルムアルデヒドを注入して組織固定を行った。左右腎臓を摘出し、Paraffin 固定したのち標本を作成した。作成した組織の顕微鏡画像を解析し、腎全体の面積に対して生成された結石面積の占有率を求めた。一匹につき、6 枚の画像を評価し、平均値を算出した。

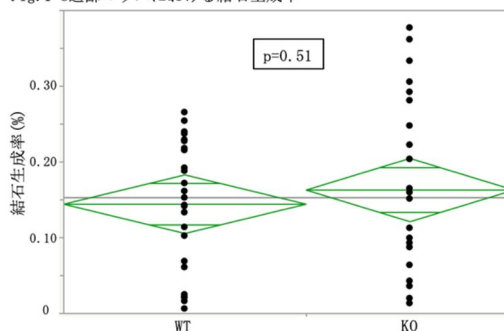
4. 研究成果

(1) 結果

8 週齢マウス

8 週齢の野生型マウス(WT)および ApoE 遺伝子欠損マウス(KO)をそれぞれ 6 匹ずつ用いて、結石生成率について評価を行った。WT マウス、KO マウス両群の結石生成率を比較したところ、 $p=0.51$ と、有意な差は認められなかった(Fig.1)。

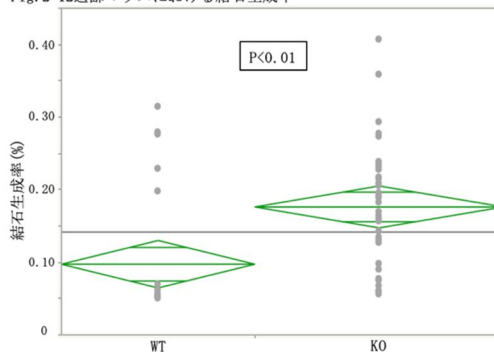
Fig. 1 8週齢マウスにおける結石生成率



12 週齢マウス

12 週齢の野生型マウス(WT)および ApoE 遺伝子欠損マウス(KO)をそれぞれ 6 匹ずつ用いて、結石生成率について評価を行った。ApoE 遺伝子欠損マウス群は野生型マウスに比べて、有意に結石生成率が高い結果であった(Fig.2)。

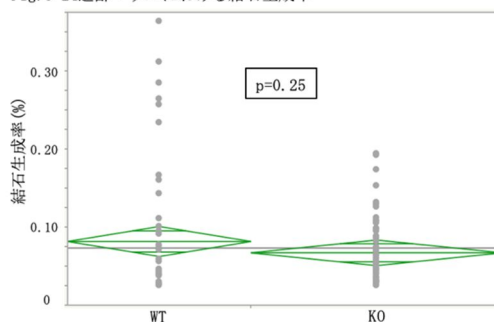
Fig. 2 12週齢マウスにおける結石生成率



24 週齢マウス

24 週齢の野生型マウス(WT)および ApoE 遺伝子欠損マウス(KO)をそれぞれ 12 匹ずつ用いて、結石生成率について評価を行った。WT マウス、KO マウスの両群間において結石生成率に有意な差は認められなかった(Fig.3)。

Fig. 3 24週齢マウスにおける結石生成率



参考文献

- 1) Kohjimoto et al. Association of metabolic syndrome traits and severity of kidney stones: results from a nationwide survey on urolithiasis in Japan. *Am J Kidney Dis* 61: 923-929, 2013
- 2) Iba et al. Insulin resistance increases the risk of urinary stone formation in a rat model of metabolic syndrome. *BJU Int* 106: 1550-1554, 2010
- 3) Itoh et al. The role of long term loading of cholesterol in renal crystal formation. *Arch Ital Urol Androl* 83: 23-25, 2011
- 4) Fujii et al. Effect of adiponectin on kidney crystal formation in metabolic syndrome model mice via inhibition of inflammation and apoptosis. *PLoS One* 8: e61343, 2013
- 5) Jin et al. Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 exacerbates renal inflammation and injury in apolipoprotein E-deficient mice through modulation of the nephrin and TNF- α -TNFRSF1A signaling. *Transl Med* 13: 255, 2015

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	原 勲 (Hara Isao)		
研究協力者	柑本 康夫 (Kohjimoto Yasuo)		
研究協力者	山下 真平 (Yamashita Shimpei)		

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