

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 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：25462519

研究課題名(和文)メタボリックシンドロームにおける接着分子の発現と腎結石促進機序の解明

研究課題名(英文) Effects of atherosclerosis-related factors on renal crystal formation in a mouse model of metabolic syndrome

研究代表者

坂倉 毅 (Sakakura, Takeshi)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00275132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：投与6日目のWTでは結石形成を認めなかったが、ob/obでは皮髄境界部を中心に有意に腎結石が形成された。Gene ontology解析では、分子機能のうち接着のカテゴリーの比率が最も高く(68.6%)、有意差を認めた。マイクロアレイ解析より2群間に有意差をもつ遺伝子群の中から接着に関連するSpp1、Fn1、Icam1、Col3a1の4遺伝子を同定した。これら4遺伝子の定量PCRでは、投与6日目のob/obは、WTと比べ有意に発現が多かった($p < 0.05$)。OPN、FN、ICAM1、COL3A1の免疫染色においても、ob/obはWTと比べ有意に発現が多かった。

研究成果の概要(英文)：There was no stone formation in WT mice, but significant renal crystal formation around the cortico-medullary junction was observed in ob/ob mice on day 6. Gene ontology analysis showed significant inter-group differences, with the highest ratio in the molecular function category of adhesion (68.6%, $p = 1.25 \times 10^{-9}$). Furthermore, 4 adhesion-related genes, Spp1, Fn1, Icam1, and Col3a1, showed significant inter-group differences in expression in the microarray analysis. The expression levels of these 4 genes on day 6 were significantly higher in ob/ob mice than in WT mice ($p < 0.05$) by quantitative PCR. The protein expression levels of these 4 factors were also significantly higher in ob/ob than in WT mice by immunohistochemical staining. The present study showed that MetS-associated renal crystal formation increased the expression of atherosclerosis-related factors, indicating that cell adhesion plays an important role in renal crystal formation as well as in arteriosclerosis.

研究分野：尿路結石

キーワード：腎結石 メタボリックシンドローム 接着

1. 研究開始当初の背景

世界における腎結石症の罹患率は、20世紀後半以降、年齢・性別・人種に関係なく増加傾向を示している。結石罹患率増加の原因として、食生活の変化、とくに脂質、動物性タンパク質摂取量の増加が指摘されている。これまでに私たちは「腎結石をメタボリックシンドローム（以下メタボ）の一疾患」として捉え、腎の遺伝学的環境変化に注目し研究を行ってきた。

腎結石とメタボ：腎結石の成因はメタボと関連していると近年考えられている。

Taylor らは 20 万人の追跡調査により、肥満・体重増加と腎結石リスクとの関連性を示した。一方、私たちは腎結石内に含まれる有機物質（マトリックス）であるオステオポンチンが、動脈硬化発生時にも発現し、腎結石と大動脈の石灰化に高い相関性があることを示した。

メタボと細胞接着分子：動脈硬化はメタボの主病態である。動脈硬化の発症機序は、血管内皮細胞に発現した細胞接着分子が血中 LDL と共に白血球を間質へ移動させ動脈硬化巣を形成する。この際に細胞接着因子であるセレクチン、フィブロネクチン、ICAM1 をはじめとして細胞接着分子の発現増加が明らかとなっている。

腎結石と細胞接着分子：結石形成においても細胞接着因子であるフィブロネクチン、ICAM1 が結石形成時にその発現が増加し結石関連遺伝子の 1 つであると報告されている。しかし、その発現増加機序は明らかになっていない。

2. 研究の目的

「腎結石はメタボの一疾患」であり、動脈硬化と発症機序が似ていることを、私たちは報告した。これまでにメタボモデルマウスを用いて、メタボ環境下では結石形成が促進することを証明した。また、同マウス

における DNA マイクロアレイ解析にて網羅的に検討し、メタボ環境下における結石関連遺伝子として 2 種類の細胞接着分子を同定した。これらの結果を踏まえ、本研究では、これらの細胞接着分子が関わる結石形成機序を次の 2 つの研究から解明する。

研究 1：メタボ環境下における結石作成と細胞接着分子の発現評価

研究 2：脂肪細胞が関与する腎尿細管上皮細胞とシュウ酸カルシウム結晶の接着能の検討

3. 研究の方法

【研究 1 メタボ環境下における結石作成と細胞接着分子の発現評価-In vivo-】

メタボリックシンドロームモデルマウスとして、ob/ob マウス (B6.V-Lep^{ob}/J) を購入し、当大学動物実験センターにて管理、交配させ、研究での必要数 (wild type, ob/ob マウス各 30 匹) まで繁殖する。ob/ob マウスの genotyping は、尻尾より抽出した DNA に対し 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して行う。また繁殖の間、迅速、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® を設計し方法を確立する。すでにシュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸の腹腔内投与で ob/ob マウスのみ結石形成を認める至適濃度もグリオキシル酸 50 mg/kg と確立している。以下に分けて行う。**結石モデルの作成**：wild type と ob/ob マウスに対し、グリオキシル酸を腹腔内投与（各 6 匹）し結石形成モデルを作成する。

結石関連物質の測定：投与 0 日目と投与 5 日目に 24 時間蓄尿を行い、シュウ酸、クエン酸、カルシウム、リン、マグネシウムなどの結石関連物質の尿中排泄量を測定する。また、投与 6 日目に sacrifice し、血清、腎を採取する。血清から結石関連物質（カルシウム、リン、マグネシ

ウム、クレアチニン)や脂質関連物質(遊離脂肪酸、総コレステロール、中性脂肪)を測定する。

結石形成量・形態の評価：摘出腎からは Pizzolato 染色と偏光顕微鏡により、結石形成の確認と画像解析ソフトである Image pro plus software をもちいて結石形成量を定量化する。

細胞接着分子・結石マトリックスの評価：摘出腎において各遺伝子、蛋白発現を定量 PCR、免疫染色、Western blotting にて検討する。(細胞接着分子：フィブロネクチン、ICAM1、VCAM1、コラーゲン 結石マトリックス：オステオポンチン、サイトカイン：TNF-)

【研究 2 脂肪細胞が関与する腎尿管上皮細胞 (M-1) とシュウ酸カルシウム水和物 (COM 結晶) の接着能の検討-In vitro-】

アディポサイトカインの機能解析を目的として脂肪細胞とマクロファージの cell line を用いた共培養研究法がすでに確立されている。マウス尿管上皮細胞 (M-1) マウス脂肪細胞 (3T3-L1) を別々に継代し、安定した cell line が確立した後に研究を行う。マウス尿管上皮細胞 (M-1) のシュウ酸カルシウム水和物 (COM) 結晶付着能と付着した結晶形態、サイトカインの発現について評価する。さらに、メタボ環境を再現するために脂肪細胞との共培養によって評価する。培養液を回収し細胞接着分子 (フィブロネクチン、ICAM1、VCAM1、コラーゲン)、結石マトリックス (オステオポンチン)、サイトカイン (TNF-) の遺伝子、蛋白発現を定量 PCR、Western blotting にて評価する。結晶接着能の定量は、¹⁴C で作成した COM 結晶を用いて行い添加する COM 結晶の濃度は 33 ~ 267 g/cm² とする。

4. 研究成果

【研究 1 メタボ環境下における結石作成と細胞接着分子の発現評価-In vivo-】

グリオキシル酸 50mg/kg を各マウス投与しメタボモデルマウスにおける結石モデルを作成した。血清、尿中における結石関連物質は WT、ob/ob 間、グリオキシル酸投与前後で比較しても有意差は見られなかった。一方、脂質関連物質では WT、ob/ob 間で有意差を認めた (p<0.05)。ただし、投与前後では有意差を認めなかった。WT では結石形成を認めなかったが、ob/ob では有意に腎結石が形成された。Gene ontology 解析では、分子機能のうち接着のカテゴリーの比率が最も高く (68.6%)、有意差を認めた。マイクロアレイ解析より 2 群間に有意差をもつ遺伝子群の中から接着に関連する Spp1、Fn1、Icam1、Col3a1 の 4 遺伝子を同定した。4 遺伝子の定量 PCR では、ob/ob は、WT と比べ有意に発現が多かった (p<0.05)。また、Tnf- も同様に発現が多かった。OPN、FN、ICAM1、COL3A1、TNF- の免疫染色においても、ob/ob は WT と比べ有意に発現が多かった (p<0.05)。

【研究 2 脂肪細胞が関与する腎尿管上皮細胞 (M-1) とシュウ酸カルシウム水和物 (COM 結晶) の接着能の検討-In vitro-】

M1 細胞を回収し Spp1、Fn1、Icam1、Col3a1、Tnf- の 5 遺伝子を定量 PCR した。4 遺伝子の定量 PCR では脂肪細胞との共培養により発現亢進を認めた (p<0.05)。また、培養液を回収し OPN、FN、ICAM1、COL3A1、TNF- の免疫染色においても、脂肪細胞との共培養では有意に発現が多かった (p<0.05)。

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 0 件)

[学会発表](計 28 件)

1. 安藤 亮介、鈴木 貞夫、細野 晃弘、山田 珠樹、田口 和己、藤井 泰普、岡田 淳志、戸澤 啓一、郡 健二郎、安井 孝周：「尿路結石症研究の最前線」メタボリックシンドロームと尿路結石。第 104 回日本泌尿器科学会総会、2016.4.23-25、仙台国際センター、東北大学百周年記念会館（宮城県仙台市）
2. Okada Atsushi, Unno Rei, Fujii Yasuhiro, Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro : Identification of the urinary macrophage-and neutrophil-related factors as new risk indexes for patients with urinary stones 尿路結石患者の新たなリスク因子となる尿中マクロファージ・好中球関連因子の同定。第 104 回日本泌尿器科学会総会、2016.4.23-25、仙台国際センター、東北大学百周年記念会館（宮城県仙台市）
3. 安井 孝周：尿路結石治療についての最近の知見。第 22 回知多半島泌尿器科セミナー、2016.3.5、アパホテル（愛知県名古屋市）
4. 安井 孝周：尿路結石の形成機序からみた治療法の開発。第 92 回 Tokyo Expert Urology Seminar、2016.2.22、東京ステーションホテル（東京都千代田区）
5. 安井 孝周：生活習慣による尿路結石の形成と予防。第 17 回千葉泌尿器科地域連携研究会、2016.2.17、三井ガーデンホテル千葉（千葉県千葉市）
6. 安井 孝周：尿路結石の分子機構の解明と新規治療法への展望。第 9 回伏見泌尿器科連携の会、2016.2.13、京都センチュリーホテル（京都府京都市）
7. 安井 孝周：尿路結石に対する新規治療法の開発をめざして。第 270 回日本泌尿器科学会東海地方会、2015.12.13、KDX 桜通ビル（愛知県名古屋市）
8. 安井 孝周：尿路結石の分子機構の解明と新規予防法の開発に向けた展望。第 66 回名古屋市立大学医学会総会、2015.12.6、名古屋市立大学（愛知県名古屋市）
9. 岡田 淳志：メタボリックシンドロームにおける尿路結石促進機序の解明と分子標的治療への応用。第 68 回日本医師会創立記念医学大会、2015.11.1、日本医師会館（東京都文京区）
10. 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、瀧本 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、長良川国際会場、岐阜都ホテル（岐阜県岐阜市）
11. 安井 孝周：尿路結石の最前線。第 60 回愛知県泌尿器科医会例会 兼 日本医師会生涯教育講座、2015.10.17、ウェスティンナゴヤキャッスル、（愛知県名古屋市）
12. 安井 孝周：尿路結石症診療ガイドラインと形成機序からみた治療法。第 7 回熊本腎尿路性器癌セミナー、2015.10.3、ANA クラウンプラザホテル熊本ニュースカイ（熊本県熊本市）
13. 安井 孝周：尿路結石の形成機序からみた治療法の開発。第 42 回神戸 UG カンファランス、2015.9.15、生田神社会館（兵庫県神戸市）
14. 岡田 淳志：尿路結石の形成機序に基づいた予防治療研究の最前線。第 13 回スキルアップ講習会、2015.9.12 - 13、中部大学（愛知県春日井市）

15. 岡田 淳志: ガイドラインに基づいた尿路結石症の診断と治療。第 22 回愛知県泌尿器科医会総会・理事会、2015.6.20、ウェスティンナゴヤキャッスル(愛知県名古屋市)
16. 藤井 泰普、岡田 淳志、左 立、市川 潤、田口 和己、濱本 周造、池上 要介、永田 大介、安井 孝周、丸山 哲史、戸澤 啓一、郡 健二郎: 腎尿細管細胞・脂肪細胞・マクロファージの共培養システムを用いたメタボリックシンドローム環境下の結石形成機序の解明。第 103 回日本泌尿器科学会総会、2015.4.18-21、石川県立音楽堂、ANA クラウンプラザ金沢 他(石川県金沢市)
17. 安井 孝周、田口 和己、濱本 周造、岡田 淳志、戸澤 啓一、郡 健二郎: 尿路結石の分子機構の解明と溶解療法に向けた研究戦略。第 103 回日本泌尿器科学会総会、2015.4.18-21、石川県立音楽堂、ANA クラウンプラザ金沢 他(石川県金沢市)
18. 藤井 泰普、岡田 淳志、海野 怜、伊藤 靖彦、市川 潤、田口和己、新美 和寛、廣瀬 泰彦、小林 隆宏、宇佐美 雅之、浜本 周造、広瀬 真仁、安井 孝周、伊藤 恭典、坂倉 毅、戸澤 啓一、郡 健二郎: 腎尿細管細胞・脂肪細胞・マクロファージの共培養システムを用いたメタボリックシンドローム環境下の結石形成機序の解明。日本尿路結石症学会第 24 回学術集会、2014.8.29-30、あべのハルカス(大阪府大阪市)
19. 藤井 泰普、岡田 淳志、田口 和己、廣瀬 泰彦、濱本 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(兵庫県神戸市)
20. Yasui Takahiro, Okada Atsushi, Kohri Kenjiro: Investigation of the effects of herbal teas rich in anti-oxidants on urine chemistry, in the context of kidney stone formation. NRS-JSPS Joint Research Project, Cape Town Research Meeting, 2014.1.29, Cape Town (Republic of South Africa)
21. 藤井 泰普、岡田 淳志、田口 和己、濱本 周造、安藤 亮介、伊藤 恭典、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よる尿路結石形成の促進と予防法への応用。第 63 回日本泌尿器科学会中部総会、2013.11.28-30、愛知県産業労働センター(愛知県名古屋市)
22. 藤井 泰普、岡田 淳志、伊藤 靖彦、田口 和己、新美 和寛、廣瀬 泰彦、宇佐美 雅之、小林 隆宏、安藤 亮介、広瀬 真仁、安井 孝周、伊藤 恭典、戸澤 啓一、郡 健二郎: アディポネクチンによる腎結石の抑制関連遺伝子の同定とそのメカニズムの解明。第 23 回日本尿路結石症学会、2013.8.30-31、学術総合センター(東京都千代田区)
23. 安井 孝周、岡田 淳志、新美 和寛、田口 和己、戸澤 啓一、郡 健二郎: 尿路結石のゲノムワイド解析による再発リスク診断法の確立。第 56 回日本腎臓学会、2013.5.10-12、東京国際フォーラム(東京都千代田区)
24. Fujii Yasuhiro, Okada Atsushi, Taguchi Kazumi, Niimi Kazuhiro, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Yasui Takahiro, Kohri Kenjiro: Elucidation of metabolic syndrome-related paracrine system by co-culturing renal tubular epithelial

- cells and adipocytes. American Urological Association Annual Meeting 2013, 2013.5.4-8, San Diego (USA)
25. Yasui Takahiro, Okada Atsushi, Zuo Li, Hirose Yasuhiko, Taguchi Kazumi, Kobayashi Takahiro, Hirose Masahito, Ando Ryosuke, Sasaki Shoichi, Kohri Kenjiro : Association between nephrolithiasis incidence and nutrition, based on data from Japanese national surveys. American Urological Association Annual Meeting 2013, 2013.5.4-8, San Diego (USA)
26. 郡 健二郎 : Oxidative stress as the basis of association between nephrolithiasis and other chronic kidney. 第 101 回日本泌尿器科学会、2013.4.25-28、さっぽろ芸術文化の館 (北海道札幌市)
27. 郡 健二郎 : 尿路結石症のリスクファクターと再発予防。第 101 回日本泌尿器科学会、2013.4.25-28、さっぽろ芸術文化の館 (北海道札幌市)
28. 郡 健二郎、岡田 淳志 : 尿路結石の成
因からみた予防法。第 101 回日本泌尿器科学会、2013.4.25-28、さっぽろ芸術文化の館 (北海道札幌市)

〔図書〕(計 4 件)

1. 戸澤啓一、岡田淳志、安井孝周 : メディ
カ出版、泌尿器ケア、2015、20(3):54-59
2. 田口和己、戸澤啓一、安井孝周 : 医学書
院、臨床泌尿器科、2015、69(4):163-166
3. 岡田淳志、郡健二郎 : 外医学社、Annual
Review 腎臓 2013、2013、219-226
4. 郡健二郎 : NHK、NHK きょうの健康、2013、
2013 年 5 月号 : 128

〔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

坂倉 毅 (SAKAKURA Takeshi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究
員
研究者番号 : 00275132

(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

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

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