

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861443

研究課題名(和文)マクロファージの2つの極性に着目した結石貪食能の解析と溶解療法の開発

研究課題名(英文)Development of crystal dissolve therapy by analyzing two macrophage phenotypes

研究代表者

田口 和己 (Taguchi, Kazumi)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00595184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：結石モデルマウスを用いた研究から、腎結石形成量は、骨髄由来M1M を投与した群では増加し、M2M を投与した群では低下した。
また尿路結石患者の尿中M 関連蛋白の発現をマルチプレックス解析を用いて調べると、結石患者では非結石患者に比べて、IL-4、G-CSF、IL-1aといった抗炎症サイトカイン、好中球遊走因子が低下していた。
さらにヒト腎結石周囲の組織においてM 関連遺伝子の発現を調べると、結石患者では炎症性M 関連遺伝子の発現が増加し、抗炎症性M 関連遺伝子の発現が低下していた。

研究成果の概要(英文)：In vivo study using stone model mice showed that renal crystal formation increased by M1M treatment whereas decreased by M2M treatment.
Urinary protein multiplex analysis demonstrated that the expression of IL-4, G-CSF, and IL-1a, which were associated with M2M and neutrophil, was decreased in stone-patients.
Gene expression profile of renal papillary tissue by microarray analysis revealed that stone-patients had higher expression of M1M-related genes but lower expression of M2M-related genes.

研究分野：尿路結石

キーワード：腎結石 マクロファージ 炎症 Randall's plaque マイクロアレイ マルチプレックス解析

1. 研究開始当初の背景

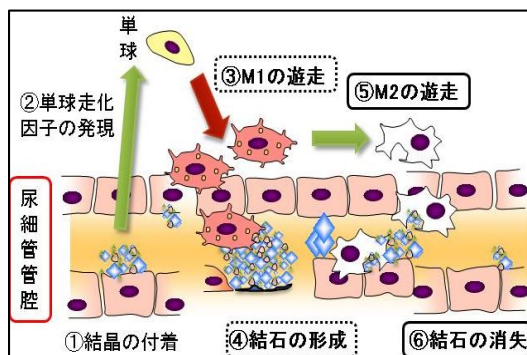
(1) 国内外の動向

わが国の腎結石生涯罹患率は、100人中約6人にも達し、5年再発率は40~50%と難治性である。しかし予防治療薬として新たに認可された薬剤はなく、形成機序の解明と再発予防法の確立が急がれる。これまでの腎結石の予防法は飲水と食事療法を中心とした、尿中の無機物質の制御が主流であったが、発症率はこの40年間で約3倍と増加の一途を辿っている。私たちは、結石成分の数%を占める有機物質(結石マトリックス)に着目し、腎結石に遺伝要因が強く関与することを明らかにし、動物モデルを用いた結石形成機序の解明に取り組んできた¹⁾。

(2) 過去の研究成果と経緯

私たちは、遺伝学的環境変化を明らかにするために、従来の結石モデルラットではなく、遺伝子改変技術のあるマウスを用いて腎結石モデルを確立した²⁾。その過程において、「腎結石が自然消失する」という興味深い現象を世界で初めて捉えることに成功した。またこの現象の中で、腎結石の形成に伴い腎間質のM₂数が増加すること、透過型電子顕微鏡の観察から、M₂が結晶を貪食している像を発見した。これらの結果をふまえ、私たちは、この微小結石消失現象のメカニズムを解明するためマイクロアレイ解析を行い、腎結石の形成と消失には腎尿細管細胞への結晶の付着、結晶塊の間質移行、ケモカイン・M-CSF(macrophage-colony stimulating factor)などのM₂走化因子発現、単球の走化・分化・血管内皮細胞との接着、M₂の成熟・貪食・細胞内消化・抗原提示・TGF- β 産生という、腎結石の貪食処理メカニズムを推測した³⁾。

一方M₁には、炎症に促進的に働くM₁と、抑制的に働くM₂といった相反する2つの極性が存在する⁴⁾。また走化因子であるgranulocyte/macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF)はM₁を、M-CSFはM₂を誘導することが分かっている。腎結石との共通点が多いことで知られる動脈硬化において、M₁が促進に、M₂が抑制に係わるという報告もある。以上より、腎には自然消失という結石を防御する機能が存在すると考えられ、M₁が形成()、M₂が消失()に係わることが推察された(下図)。



また私たちはM-CSFが欠損したM₂機能不全マウス(op/op)を用いて腎結石形成実験を行った。その結果、op/opではM₂が欠損しており、腎結石量は野生型(+/+)より有意に多かった。またop/opへのM-CSFの投与によりM₂の発現が増加し、腎結石の形成量は低下した。このことから、M₂が腎結石を抑制する機能を有する可能性を私たちは見いだした。また腎結石の関連遺伝子に関わる遺伝子改変マウスおよび薬剤投与ラットを用いた研究においても、腎結石形成過程にM₂が重要な機能を有する可能性を示している。

以上より、M-CSFを介したM₂の活性が腎結石の抑制を担っていることが分かった。本研究では、M₂の極性に着目して腎結石形成および自然消失のメカニズムを解析するとともに、この成果から新たな予防治療薬へとつながる知見を得る。

2. 研究の目的

私たちは、「腎結石が自然消失する」という、これまでにない現象を発見した。さらにこの現象にM₂による腎結石の貪食が関わっていることを示した。一方、M₁には炎症に促進的に働くM₁と、抑制的に働くM₂の2つの極性が存在することが分かっている。このことから私たちは、M₂は腎結石の形成と消失の異なる作用があり、結石患者と健常者ではその働きに相違点があると推察した。そこで本研究では、以下の3つの方法により、モデルマウスおよびヒトM₂の極性による機能の相違を明らかにするとともに、結石の貪食作用を調べ、腎結石溶解療法につなげる研究をする。

- (1) 結石モデルマウスへのM₁・M₂誘導における腎結石形成の観察
- (2) 腎結石形成に関わるヒト尿中M₂関連蛋白のマルチプレックス解析
- (3) 腎乳頭部の結石形成部位における2つの極性のM₂発現の分析

本研究では、M₂機能不全マウスのみならず、これまでに研究の基礎を築いてきた結石モデルマウスにおいてM₁およびM₂の結石形成に対する働きを検証する。M₂関連蛋白と結石形成に照準を絞ったヒト検体の解析は世界初の試みとなり、この結果から腎結石患者と正常人との間で結石防御能に関与するM₂機能の差を見いだせる可能性がある。M₂のもつ結石防御能を解析することにより、将来の結石予防治療薬につながる基礎データとしたい。

3. 研究の方法

- (1) 結石モデルマウスへのM₁・M₂誘導における腎結石形成の観察

8週齢雄のC57BL/6Jに対し、腎結石モデルマウスの手法に順じ、シュウ酸前駆物質グリオキシリル酸(GOx) 80mg/kgで6日間腹腔内投

与を行う。また LPS・IFN- の投与により M1M を誘導した群と、IL-4・IL-13 により M2M を誘導した群を作成し、結石モデル群と比較した。6 日目に腎検体・血液の採取と 24 時間蓄尿を行う。血液検体および尿検体は、結石関連無機物質を測定した。腎結石形成は、シュウ酸カルシウム染色(Pizzolato 染色)と偏光顕微鏡により同定し、画像解析ソフトで (Image Pro Plus®) で定量化した。腎 M は、M1(CD11c, iNOS, TNF , IL-6 など)、M2(CD163, CD206, Arginase, IL-10 など)に関して、免疫染色、Western blotting および定量 PCR によって同定した。

以下の研究の遂行に伴い、名古屋市立大学大学院医学研究科倫理審査委員会での承認を取得した。

(2)腎結石形成に関わるヒト尿中 M 関連蛋白のマルチプレックス解析

名古屋市立大学病院 泌尿器科 尿路結石専門外来を通過する尿路結石症患者と、一般外来を受診する良性疾患患者(前立腺肥大症など)尿検体を同意の下に採取した。

マルチプレックス解析システム(MAGPIX®)によって、MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Panel 上の約 18 種類の炎症・免疫関連蛋白を同一検体から定量する。この結果より、腎結石患者が統計学的に有意に高値または低値を示す項目を検出した。

(3)腎乳頭部の結石形成部位における 2 つの極性の M 発現の分析

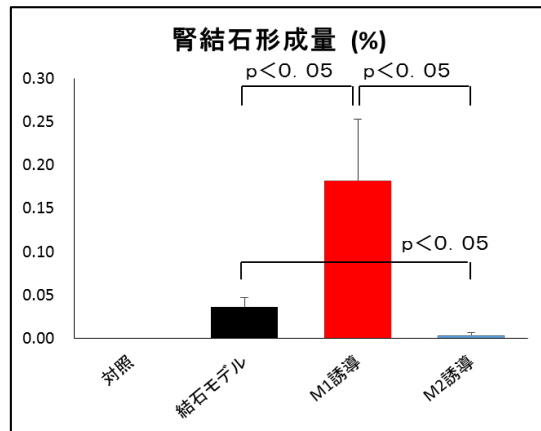
腎結石患者の大部分を占める特発性のシュウ酸カルシウム結石の形成には、腎乳頭部内側の間質における石灰化病変 (Randall ' s Plaque) の存在が契機となることが分かっている。腎乳頭部における結石形成の過程を解明することが、結石の防御に必要不可欠と考え、そこでの M の働き・関連を調べた。

名古屋市立大学病院および関連施設の泌尿器科にて腎結石の鏡視下手術を施行する患者と、血尿などにて精査の内視鏡を行う患者の腎乳頭組織を同意の下に採取した。鏡視下にて腎乳頭部の生検を行い、組織採取する。パラフィン固定後、シュウ酸カルシウムやリン酸カルシウム染色を行った。RNA を抽出しマイクロアレイ (Agilent 社) 解析により、M1/M2M の関連遺伝子の発現を調べた。

4 . 研究成果

(1)結石モデルマウスへの M1・M2 誘導における腎結石形成の観察

結石モデル群と比較し、腎結石形成量は、M1 誘導群では有意に増加し、M2 誘導群では有意に減少した (下図)。尿中結晶量は 4 群間で有意差はみられなかった。M1 誘導群では、炎症・細胞接着の関連遺伝子の発現が高値であった。

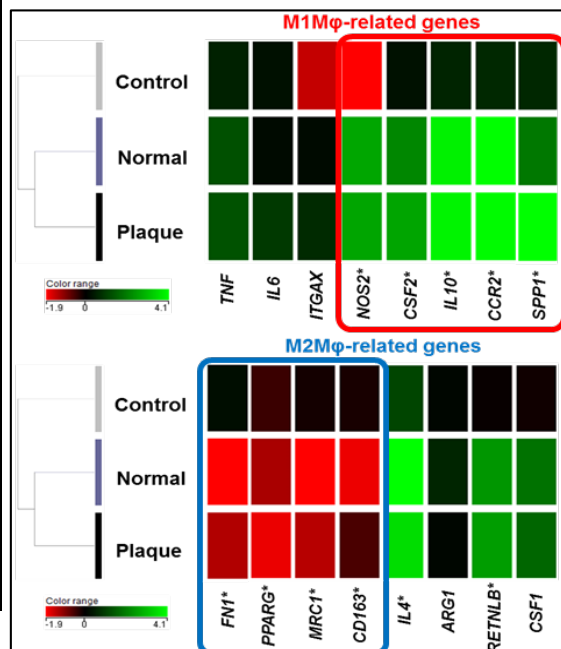


(2)腎結石形成に関わるヒト尿中 M 関連蛋白のマルチプレックス解析

非結石患者 111 名、尿路結石初発患者 41 名、尿路結石再発患者 89 名がエントリーした。それぞれ一時尿を用いて 18 因子のマクロファージなど炎症関連蛋白を測定したところ、多変量解析により、尿路結石患者では M2M を誘導する Interleukin (IL)-4 と、好中球走化因子である granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)、IL-1a の発現が低下していた。

(3)腎乳頭部の結石形成部位における 2 つの極性の M 発現の分析

腎乳頭生検組織の観察から、Randall ' s Plaque はリン酸カルシウムで構成されており、結石マトリックスであるオステオポンチンおよびコラーゲンの集積を認めた。また周囲組織のマイクロアレイ解析からは、対照患者 (C) と比べ、結石患者では、正常粘膜部位 (N) も Randall ' s Plaque 部位 (P) もいずれにおいても M1 関連遺伝子である NOS2、CSF2、IL10、CCR2、SPP1 の発現が高値であり、M2 関連遺伝子である FN1、PPARG、MRC1、CD163 の発現が低値であった (下図)。



これらの結果から尿路結石の形成に対し、M1M が促進的に、M2M が促成的に働くことが示された。

<引用文献>

1. Okada A, Yasui T, Hamamoto S, et al: Genome-wide analysis of genes related to kidney stone formation and elimination in the calcium oxalate nephrolithiasis model mouse: detection of stone-preventive factors and involvement of macrophage activity. J Bone Miner Res. 2009 May;24(5):908-24.
2. Okada A, Nomura S, Higashibata Y, et al: Successful formation of calcium oxalate crystal deposition in mouse kidney by intraabdominal glyoxylate injection. Urol Res. 2007 Apr;35(2):89-99.
3. Okada A, Yasui T, Fujii Y, et al: Renal macrophage migration and crystal phagocytosis via inflammatory-related gene expression during kidney stone formation and elimination in mice: Detection by association analysis of stone-related gene expression and microstructural observation. J Bone Miner Res. 2010 Dec;25(12):2701-11.
4. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al: Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. Immunity. 2014 Jul 17;41(1):14-20.

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14件)

1. 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. 査読有. PPAR Res. 2016:9605890. doi: 10.1155/2016/9605890.
2. 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. 査読有. J Urol. 194:1787-1796, 2015. doi: 10.1016/j.juro.2015.07.083.
3. Taguchi K, Hamamoto S, Okada A, Mizuno K, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K, Yasui T: First case report of staghorn calculi successfully removed by

mini-endoscopic combined intrarenal surgery in a 2-year-old boy. 査読有. Int J Urol. 22:978-980, 2015. doi: 10.1111/iju.12860.

4. 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. 査読有. J Am Soc Nephrol. 25:1680-1697, 2014. doi: 10.1681/ASN.2013060675.
5. Zuo L, Okada A, Yasui T, Taguchi K, Ito Y, Hirose Y, Fujii Y, Niimi K, Hamamoto S, Ando R, Itoh Y, Zou J, Tozawa K, Kohri K: A Paracrine Mechanism Involving Renal Tubular Cells, Adipocytes and Macrophages Promotes Kidney Stone Formation in a Simulated Metabolic Syndrome Environment. 査読有. J Urol. 191:1906-1912, 2014. doi: 10.1016/j.juro.2014.01.013.

[学会発表](計93件)

1. 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, 2016.3.11-15, Munich(German)
2. Taguchi Kazumi, Unno Rei, Hirose Yasuhiko, Hamamoto Shuzo, Kobayashi Takahiro, Ando Ryosuke, Okada Atsushi, Itoh Yasunori, Yasui, Takahiro, Tozawa Keiichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: PPAR- / agonists have different effects on renal crystal formation in hyperoxaluric animal models. American Urological Association Annual Meeting 2015, 2015.5.15-19, New Orleans(USA)
3. 田口 和己, 浜本 周造, 海野 怜, 宇佐美 雅之, 伊藤 靖彦, 広瀬 真仁, 安藤 亮介, 岡田 淳志, 藤田 圭治, 戸澤 啓一, 安井 孝周, 郡 健二郎: 尿路結石分子標的治療を目指した網羅的遺伝子解析によるRandall's Plaqueの発症制御遺伝子の同定. 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)
4. 田口 和己, 海野 怜, 安藤 亮介, 岡田 淳志, 戸澤 啓一, 郡 健二郎, 安井 孝周: 腎結石形成を制御するM1・M2マクロファージの機能解析. 第58回日本腎臓学会学術総会, 2015.6.5-7, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市熱田区)
5. 田口 和己, 海野 怜, 安藤 亮介, 岡田

淳志、戸澤 啓一、安井 孝周、郡 健二郎:マクロファージによる尿路結石防御メカニズムの解明と溶解療法への臨床応用。第 103 回日本泌尿器科学会総会、2015.4.18-21、石川県立音楽堂(石川県金沢市)

〔図書〕(計 4 件)

1. 田口和己、安井孝周:基礎と実践 Expert's Guide 泌尿器系・生殖器系疾患 尿路結石。薬局増刊号 病気とくすり 2016、南山堂 67(4): 2016、5 ページ
2. 田口和己、戸澤啓一、安井孝周:4. 尿路結石症 尿路結石。泌尿器科外来パーフェクトガイド、臨床泌尿器科(増刊号)、医学書院 69(4): 2015、4 ページ
3. 安井孝周、岡田淳志、安藤亮介、田口和己、戸澤啓一:特集 尿路結石症診療ガイドライン改訂のポイント - ここが変わった - 尿路結石症の疫学 - ガイドラインここが変わった -。泌尿器外科、医学図書出版、28(5): 2015、899-905 ページ
4. 戸澤啓一、岡田淳志、海野怜、田口和己、安井孝周:特集 かかりつけ医のための尿路結石 尿路結石 再発予防の薬物療法。成人病と生活習慣病、東京医学社 45(8): 2015、1015-1018 ページ

〔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

田口 和己(TAGUCHI Kazumi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号: 25861443

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし