

食習慣のメタボ化におけるマクロファージ表現型の変化に着目した尿路結石治療法の開発

田口和己

名古屋市立大学大学院医学研究科腎・泌尿器科学分野 博士課程

緒言

尿路結石の生涯罹患率は食生活の欧米化に伴い上昇し、100人中15人に達している。またその5年再発率は40～50%と高く、医療のみならず経済を圧迫する社会問題になっている。尿路結石患者は、肥満、高血圧症、糖尿病、高脂血症を合併する人が多く、「尿路結石は、メタボリックシンドローム (MetS) の一病態」と考えられる。しかし、現在の尿路結石の治療法は、内服薬による排石促進や、外科的治療による結石破碎であり、分子生物学的観点からの治療法は確立されていない。

私たちは、横断研究やモデルマウスを用いた研究において、尿路結石が、MetSの1つである動脈硬化病変と類似していることを発見した¹⁾。またこの現象の中で、結石の形成に伴い腎間質のマクロファージ (Mφ) 数が増加し、結晶を貪食している像を発見した。これらの結果から、私たちはマイクロアレイ解析を行い、腎結石の形成と消失には①腎尿管細胞への結晶の付着、②結晶塊の間質移行、③ケモカイン・サイトカインなどの発現、④単球の走化・分化・血管内皮細胞との接着、⑤Mφの成熟・貪食・細胞内消化・抗原提示という、結石の貪食処理メカニズムを推測した²⁾(図1)。

一方Mφには、炎症に促進的に働くM1型と、抑制的に働くM2型があると言われており³⁾、MetS環境下などM1は脂肪細胞と関連があり、M2は組織修復に関係することがわかっている^{4,5)}。私たちは脂肪細胞と腎尿管細胞の共培養システムを用い、尿管上皮への結晶付着時はM1関連遺伝子が強く発現し、脂肪細胞がそれを促進すること⁶⁾、M2が機能不全となり相対的にM1有意となったマウスでは、腎結石形成量が増加することを発見した⁷⁾。

これらの研究成果を踏まえ、本研究ではMetSとMφ表現型との関連に着目し、尿路結石形成機序の解析を行い、分子生物学的な治療法の確立を目指した基礎研究を行った。

実験方法

1. 脂肪細胞・マクロファージ・腎尿管細胞のパラクライン環境による尿路結石形成機序の解析

マウス尿管上皮細胞 (M-1)、脂肪細胞 (3T3-L1)、マクロファージ細胞 (RAW264.7) を共培養し、パラクライン環境において、結晶が尿管上皮細胞に及ぼす炎症・作用を解析した。①control群：M-1、②脂肪細胞群：M-1、3T3-L1の共培養、③Mφ群：M-1、RAW264.7の共培養、④脂肪細胞-Mφ群：M-1、3T3-L1、RAW264.7の共培養の4群を準備した。シュウ酸カルシウム一水化物 (COM) 結晶をM-1に添加し、48時間後の付着量を定量化した。また、各群のM-1のSpp1、Ccl2、Tnf、Il6の発現を定量PCRで比較した。さらに、細胞間のパラクライン因子を調べるため、各群の培養液中のOPN、MCP-1、TNF-α、IL-6の濃度をELISAで比較した。

2. 高脂肪食の投与によるメタボリックシンドロームモデルにおける尿路結石形成の評価

MetS環境下において、MetSの表現型およびアディポサイトカインが尿路結石の形成に及ぼす影響を、MetSモデルマウスを用いて分子生物学的に解析する。MetSモデルマウスとしてob/obマウス (B6.Cg-Lep^{ob}/J) を

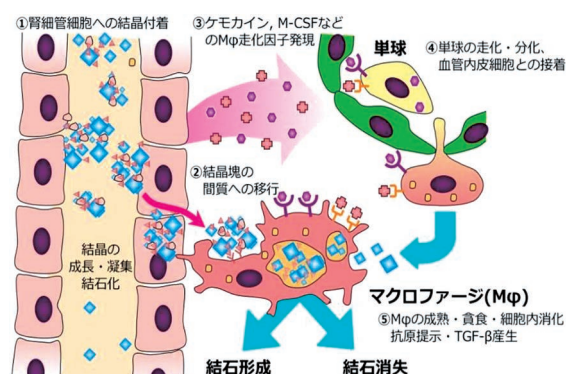


図1 メタボリックシンドロームに類似した尿路結石形成にかかわるマクロファージの働き

用いた。野生型であるLeanを対照に、8週齢から普通食を与えた群 (Ctl群)、高脂肪食 (HFD-60) を与えた群 (HFD群)、シュウ酸前駆物質であるエチレングリコール (EG) を自由飲水された群 (EG群) と高脂肪食とEGを与えた群 (HFD+EG群) (各n=6) に分け、2週後に血清、24時間尿、腎を採取した。腎組織中の結石形成量を偏光顕微鏡と、シュウ酸カルシウム染色であるPizzolato染色にて評価し、画像解析ソフトにて定量化を行った。また結石およびMφ関連遺伝子とアディポサイトカインをPCR、Flow cytometryを用いて定量、評価した。

統計学的解析

SAS® ver9.1を使用し、各群間の有意差 (p<0.05) は、Mann-Whitney U検定およびANOVAにより検定を行った。

結果

1. 脂肪細胞・マクロファージ・腎尿管細胞のパラライン環境による尿路結石形成機序の解析

M-1へのCOM付着量は、control群と比較し、脂肪細胞群2.06倍、Mφ群1.98倍、脂肪細胞-Mφ群3.24倍といずれも有意に高値を示した (図2)。

定量PCRによるM-1細胞の発現解析は、control群と比較し、脂肪細胞群ではCcl2とTnf、Mφ群ではSpp1、脂肪細胞-Mφ群ではSpp1、Ccl2およびTnfがそれぞれ有意に高値を示した (図3)。

またELISAによる培養液中のタンパク濃度の解析は、control群と比較し、脂肪細胞群ではMCP-1、TNF-α、Mφ群ではOPN、脂肪細胞-Mφ群では4因子すべて (OPN、MCP-1、TNF-α、IL-6) が有意に高値を示した (図4)。

2. 高脂肪食の投与によるメタボリックシンドロームモデルにおける尿路結石形成の評価

HFD+EG群のOb/Obマウスでは、腎皮髄境界部を中心にびまん性に、尿細管腔内に嵌頓するシュウ酸カルシウムの結晶の沈着を認めた。Leanおよびその他の群では腎結石形成は認められなかった (図5)。

Ob/ObマウスはLeptin遺伝子の欠損に伴う過食により、すべての群でLeanよりも1.7~2.0倍の体重を示した。Ctl群のOb/Obマウスは、Leanと比べ、血中のCaおよびTC濃度、尿中のCa、P、およびMg排泄量が高値であった。HFD+EG群のOb/Obマウスでは、Leanと比べ、血中Cr濃度が2.59倍、血糖値が1.91倍、中性脂肪が6.53倍に増加していた。また、EGおよびHFD+EG群では、LeanとOb/Obマウスとも、尿中のシュウ酸排泄量が有意に高値を示した (data not shown)。

腎組織中のアディポサイトカインの発現では、CtlおよびHFD+EG群のOb/ObマウスではLeanに比べ、Adipoqの発現が有意に低値であったが、Ccl2、Il6、Spp1、Tnfは他の群と比較しても有意に高値を示した (図6A)。免疫組織化学染色からは、MCP-1、IL-6、

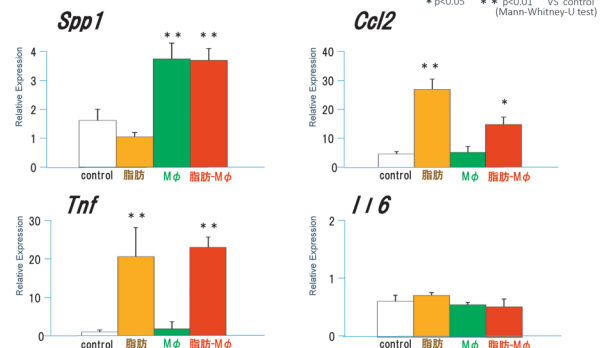


図3 腎尿管上皮細胞(M-1) 中の遺伝子発現解析

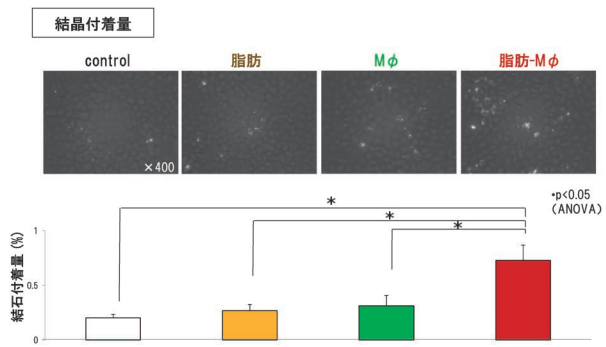


図2 腎尿管上皮細胞(M-1) へのシュウ酸カルシウム1水和物結晶の付着量

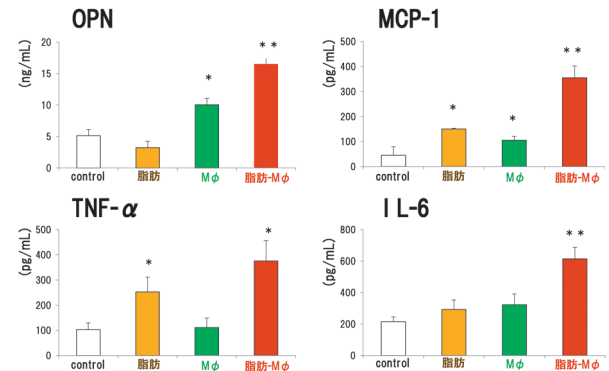


図4 培養液中の発現タンパク濃度解析

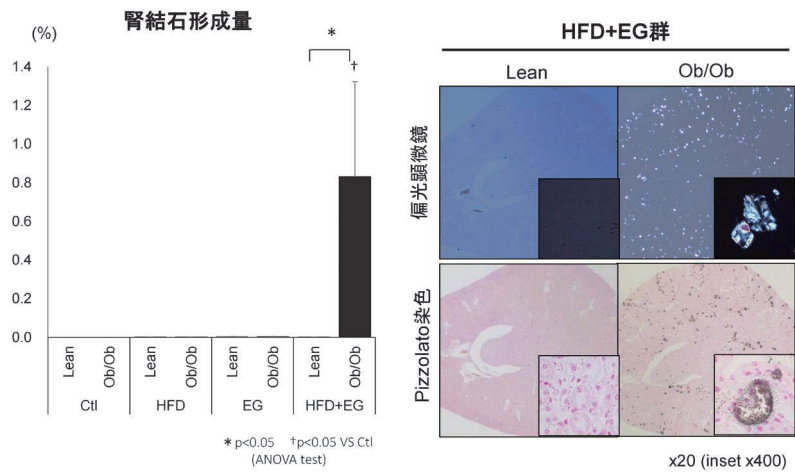


図5 腎結石形成量

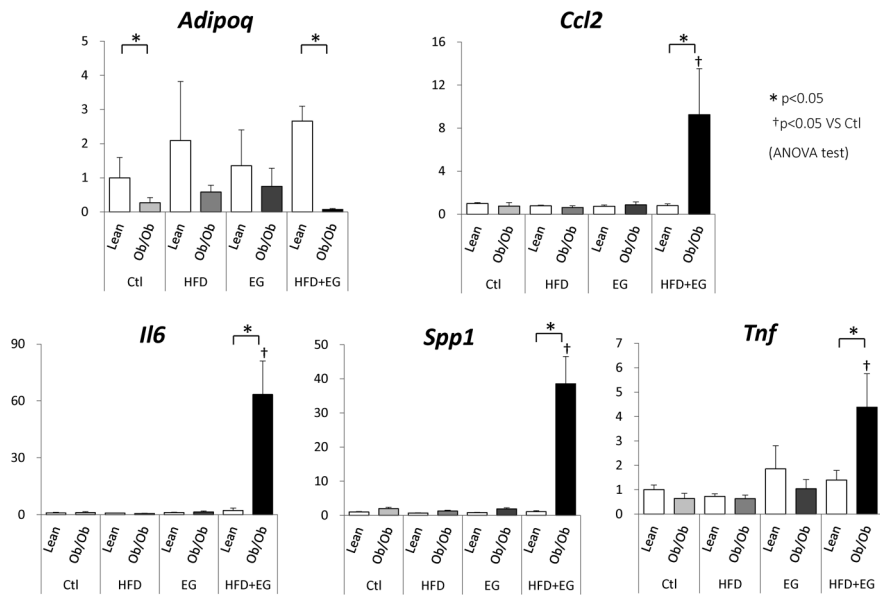


図6A 腎組織中のアディポサイトカイン(mRNA)の発現

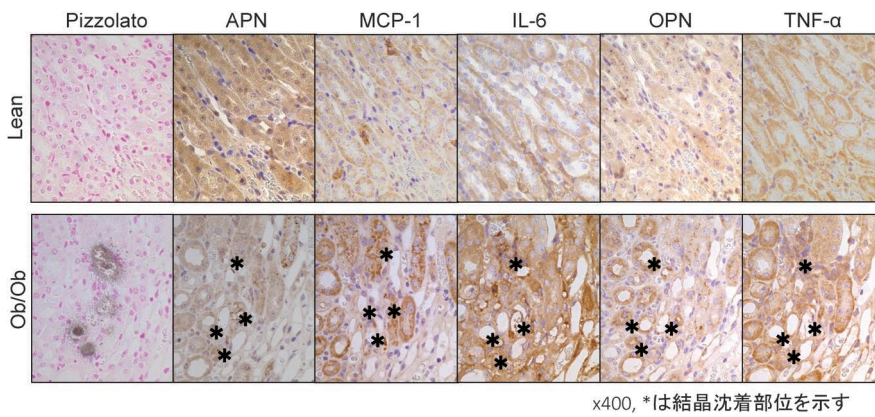


図6B 腎組織中のアディポサイトカイン(タンパク)の発現

腎組織Mφ数

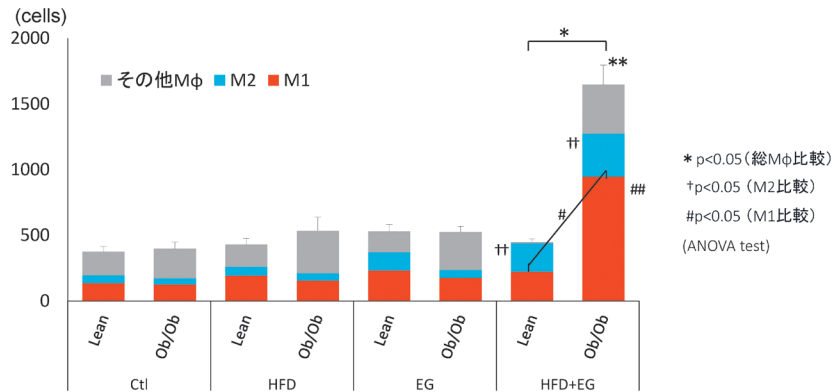
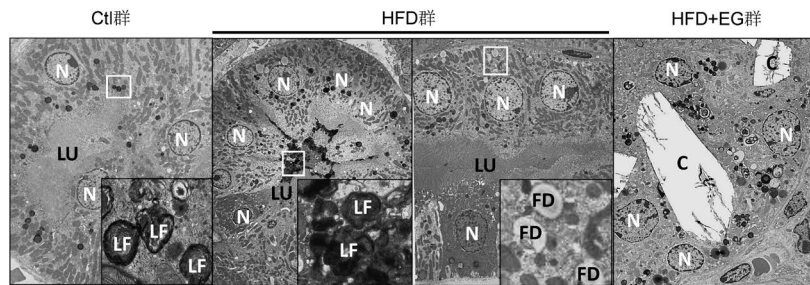


図7 腎組織中のMφ(M1/M2)数



N, nucleus; LU, lumen; LF, lipid fragment; FD, fat droplet; C, crystal. x2000 (inset x10,000)

図8 Ob/Obマウスにおける尿細管上皮細胞内の超微細構造の観察

OPN、TNF- α はOb/Obマウスの結晶沈着した尿細管上皮細胞の管腔側を中心に、周囲の間質でも強胃発現を認め、APNでは発現の低下を認めた(図6B)。

Flow cytometryによる腎組織中のM1およびM2の比較では、HFD+EG群のOb/ObマウスではM1および総Mφ数が有意に高値であった。またHFD+EG群では、その他の群と比べ、LeanおよびOb/ObマウスともにM2数が増加していた(図7)。

透過型電子顕微鏡による超微細構造の観察では、Ob/Obマウスの腎尿細管上皮細胞には、細胞質内にlipid fragmentが存在し、HFD群ではfat dropletが出現し、HFD+EG群では結晶が沈着している像が示された(図8)。

考 察

本研究の結果より、MetS環境における腎尿細管上皮細胞は、脂肪細胞との共存で炎症が惹起され、Mφとの共存でOPNの発現が亢進すると考えられた。さらに、脂肪とMφの共存では、IL-6を介したパラクラインによ

りこれらの変化が促進されることが結石形成につながることを示唆された。これらの*in vitro*の研究から腎尿細管上皮細胞への結晶の付着を介した結石形成には、Mφおよび脂肪細胞からの炎症性アディポサイトカインが重要な働きを担っていることがわかった。

また今回私たちは、MetSモデルであるOb/Obでは抗シュウ酸尿の惹起により、腎結石形成が引き起こされることを発見した。Ob/Obマウスは、肥満モデルとして用いられ、コレステロール・中性脂肪・血糖などの脂質・耐糖能異常を認めることがわかっている⁸⁾。それに加え、本研究結果から、Ca、P、Mgなどの電解質異常も合併することが示された。Ob/Obマウスでは、高脂肪食およびEGの負荷によって、炎症性的アディポサイトカインと炎症性MφであるM1の増加を認めており、これらの炎症促進に、生来の代謝異常が合わさり、結晶の増大と尿細管管腔内での沈着を認めたのではないかと考えられた。透過型電子顕微鏡からは、Ob/Obマウスでは、高脂肪食の投与によって脂質の尿細管腔内への沈着が観察されており、脂質がMφや結晶成分とともに一

塊となり、結石化を来すのではないかと推察された。

本研究から、MetS環境下では脂肪およびM1による炎症反応の増加が尿路結石の形成を促進していることが示唆された。今後、抗炎症アディポサイトカイン、M2への誘導に着目した、脂肪細胞やM1によるパラクラインの抑制が、新たな尿路結石の治療法になりうると考えられた。

要 約

食生活の欧米化とともに、尿路結石症の罹患率は増加しており、「MetSの一病態」と考えられるようになってきている。私たちのこれまでの研究から、尿路結石の形成にはM ϕ がかかわることが示唆されている。そこで本研究では、MetSの病態とM ϕ の表現型に着目し、MetS環境下における尿路結石形成機序を解明し、新規治療法の開発への基礎研究を行った。

*In vitro*の研究から、腎尿細管上皮細胞への結晶の付着には、脂肪細胞・M ϕ の共培養によるパラクライン環境での炎症性アディポサイトカインの増加がかかわっていた。MetSモデルであるOb/Obマウスを用いた研究からは、Ob/Obマウスでは高脂肪食とEGの投与により腎結石が形成され、代謝障害および炎症性アディポサイト

カイン・M ϕ の関与が促進していることが示唆された。今後、これらMetS環境における炎症応答を抑制することで、尿路結石の形成を予防する新規治療の開発が望まれる。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に心より感謝申し上げます。また直接ご指導ご高配を賜りました本学の郡健二郎理事長、ならびに大学院医学研究科腎・泌尿器科学分野の安井孝周教授をはじめとする教室員の先生方に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) R. Ando, et al.: *J. Urol.*, **189**, 1340–1346, 2013.
- 2) A. Okada, et al.: *J. Bone Miner Res.*, **24**, 908–924, 2009.
- 3) A. Mantovani, et al.: *Trends Immunol.*, **25**, 677–686, 2004.
- 4) M. Z. Zhang, et al.: *J. Clin. Invest.*, **122**, 4519–4532, 2012.
- 5) S. Lee, et al.: *J. Am. Soc. Nephrol.*, **22**, 317–326, 2011.
- 6) J. Ichikawa, et al.: *Urolithiasis*, **42**, 17–28, 2014.
- 7) K. Taguchi, et al.: *J. Am. Soc. Nephrol.*, **25**, 1680–1697, 2014.
- 8) A. J. Kennedy, et al.: *Dis. Model Mech.*, **3**, 156–166, 2010.