



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	第 1007 号
氏名	田口 和己
授与年月日	平成 26 年 3 月 25 日
学位論文の題名	CSF-1 signaling suppresses renal crystal formation (CSF-1 シグナルは腎結石の形成を抑制する) Journal of the American Society of Nephrology. in press
論文審査担当者	主査： 高橋 智 副査： 三好 一郎, 郡 健二郎

論文内容の要旨

【背景と目的】

「腎結石が自然消失する」という新しい現象を捉え、この現象にはマクロファージ(M ϕ)の腎結晶貪食作用が関わっている可能性を、私たちはこれまでに示した。M ϕ には、炎症性のM1と、抗炎症性のM2の2型が存在する。M2は、走化因子である macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)により分化し、組織障害の修復に係わることがわかっている。私たちは、これらの知見から、M-CSFにより誘導されるM2が、結石の消失に係わっているのではないかと推察した。そこで本研究では、腎結石の溶解療法の開発を目指し、M2機能不全マウスを用いた腎結石形成モデルでの抑制機序を調べるとともに、骨髄由来のM2によるシュウ酸カルシウム1水和物(COM)結晶の貪食機能を解析した。

【方法】

研究①：8週齢雄のM2機能不全マウス(op/op)を用い、野生型(+/+)、ヘテロ型(+op)を対照群とした。結石形成モデルの手法に準じ、グリオキシル酸80mg/kgを連日腹腔内投与し、投与後0,6日目に腎組織を採取した。M2の分化を促進させるため、さらに組換え型ヒトM-CSF 5.0 μ g/bodyを6日間同時投与した群も作成し、計6群とした。腎結石形成を偏光顕微鏡およびシュウ酸カルシウム染色により評価した。結石関連遺伝子として osteopontin(OPN)、monocyte chemoattractant factor 1(MCP-1)、CD44を、M ϕ 関連遺伝子としてM1(CD11c, iNOS, IL-6, TNF- α)、M2(CD163, CD206, Ym-1, Arginase1)の発現を免疫染色・Western blot・定量PCR法を用いて評価した。さらに腎組織中のM2を、表面マーカーを用い flow cytometryにて定量化し、比較した。

研究②：8週齢+/+の大腿骨・脛骨から骨髄細胞を採取し、7日間培養させて骨髄由来M ϕ とし、その後 granulocyte macrophage-colony stimulating factorを用いてM1に、M-CSFを用いてM2に分化させた。M1、M2に蛍光標識させたCOM 25 μ g/cm²を暴露し、0,1,6,24時間後に細胞を回収して flow cytometryによるCOM貪食能の比較を行った。結石およびM ϕ 関連遺伝子を定量PCR法により評価した。さらに中和抗体を用いたOPN, MCP-1, CD44の抑制下において、同様にM2にCOMを暴露し、貪食能の変化を比較した。

研究③：8週齢雄の+/+、op/opに研究②で用いた骨髄由来のM2(1.0x10⁶個)を尾静脈から投与し、その後にグリオキシル酸80mg/kgを6日間腹腔内投与し、研究①と同様に腎結石形成・結石関連遺伝子・M ϕ 関連遺伝子・M2の発現を評価した。

研究④：研究②で得られた骨髄由来のM1・M2と、8週齢雄の+/+およびop/opの腎組織から抽出したM ϕ らを、microarrayによるゲノムワイド解析を行い、遺伝子発現を比較した。

【結果】

研究①：op/op群の結石形成量は、+/+・+/op群と比べて約10倍に増加していた(P=0.003)。結石関連遺伝子であるOPN・MCP-1・CD44は、op/op群において有意な発現増加を認めた。M-CSFの投与により、いずれの表現型においても結石形成量は減少し、結石関連遺伝子の発現も低下した。M2およびその関連遺伝子の発現は、op/op群においてのみ有意に低下しており、M-CSFの投与により増加した。

研究②：M2はM1に比べて、COM貪食率および結石関連遺伝子の発現が有意に高値であった。

M2 では、抗炎症性サイトカインである Ym-1・Arginase1 の発現が著明に高値であった。さらに MCP-1・CD44 の中和抗体を用いた結石関連遺伝子の抑制により、M2 の COM 貪食率は増加した。

研究③：M2 の経静脈的投与により、op/op 群では、腎組織中の M2 の発現が増加し、結石形成量・結石関連遺伝子の発現は有意に低下した。

研究④：op/op 由来の腎 Mφ では、+/+と比較して M2 関連遺伝子の発現が低下していた。

【考察】

本研究から、CSF-1 シグナルによって M2 が結石関連遺伝子を介した結晶貪食作用を発揮し、腎結石の形成を抑制することが分かった。

論文審査の結果の要旨

【目的】腎結石の自然消失にM ϕ が関与している可能性が報告されている。M ϕ には炎症時に活性化するM1M ϕ と、それとは対極的に抗炎症効果を有するM2M ϕ の2型が存在する。M2M ϕ は走化因子であるM-CSFにより分化し、創傷治癒に関わることが知られている。これらの知見から、M2M ϕ が結石消失に関わっているのではないかと推察し、腎結石形成モデルでの抑制機序におけるM2M ϕ の役割を解析した。

【方法】〈実験1〉8週齢雄のM2機能不全マウス(op/op)、ヘテロ型(+/op)、野生型(+/+)マウスにグリオキシル酸80mg/kgを連日腹腔内投与して腎結石を惹起し、0,6日目に腎組織を採取した。M2M ϕ の分化を促進させるため、M-CSFを6日間同時投与した群も作成した。腎結石形成量を評価するとともに、結石関連遺伝子としてosteopontin(OPN)、MCP-1、CD44、M ϕ 関連遺伝子としてM1M ϕ (CD11c, iNOS, IL-6, TNF α)、M2M ϕ (CD163, CD206, Ym-1, Arginase1)の発現を免疫染色・Western blot・定量PCR法を用いて評価した。さらに腎組織中のM2M ϕ をflow cytometryにて定量化し、比較検討した。〈実験2〉8週齢+/+から骨髓細胞を採取し、7日間培養させて骨髓由来M ϕ とし、その後GM-CSFを用いてM1M ϕ に、M-CSF, IL-4を用いてM2M ϕ に分化させた。M1, M2M ϕ に蛍光標識させたシュウ酸カルシウム1水和物(COM)を暴露し、0, 1, 6, 24時間後に細胞を回収してCOM貪食能を比較した。さらにOPN, MCP-1, CD44抗体により中和した後、M2M ϕ によるCOM貪食能の変化を検討した。〈実験3〉8週齢雄の+/+, op/opに骨髓由来M2M ϕ (1.0×10^6 個)を尾静脈から投与し、腎結石形成に対する効果を評価した。〈実験4〉骨髓由来M1, M2M ϕ と8週齢雄の+/+およびop/opの腎組織から抽出したM ϕ についてマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現を比較した。

【結果】〈実験1〉op/op群における結石形成量は、+/+, +/op群に比較して約10倍増加し、OPN, MCP-1, CD44発現は、op/op群において有意に増加していた。いずれの表現型においても、M-CSF投与により結石形成量は減少し、結石関連遺伝子発現も低下した。M2M ϕ およびその関連遺伝子発現はop/op群においてのみ有意に低下し、M-CSF投与により増加した。〈実験2〉COM貪食率および結石関連遺伝子発現はM2M ϕ で有意に高値を示した。さらにM2M ϕ によるCOM貪食率はMCP-1あるいはCD44中和抗体により増加した。〈実験3〉経静脈的にM2M ϕ を注入することにより、op/op群では腎結石形成量・結石関連遺伝子の発現は有意に低下し、腎組織中のM2M ϕ 数が増加した。〈実験4〉op/op由来の腎M ϕ では、+/+と比較してM2関連遺伝子の発現が全般的に低下していた。

【考察】CSF-1シグナルにより腎結石形成が抑制されたが、これにはM2M ϕ 増加による結晶貪食作用の亢進が関与していることが明らかとなった。

【審査内容】主査の高橋から、CD163+CD206+M ϕ のみをM2M ϕ としているのか、M2M ϕ をCD44抗体で中和することによって結石貪食能が亢進する機序は何かなど10項目、第一副査の三好教授からは、今回の結石モデルはヒトの尿路結石をどの程度反映するものなのか、M2M ϕ の注入による結石治療効果は明らかであるが、ヒトへの応用の可能性についてはどのように考えているかなど8項目、さらに第二副査の郡教授からは治療を目的としたM2M ϕ の応用は動脈硬化症など他の疾患でどの程度報告されているのか、腎細胞癌治療のトピックスについての質問があった。これらの質問に対して申請者から適切な回答が得られ、学位論文の内容を十分に理解していると判断した。本研究はCSF-1シグナルが結石形成に対する抑制因子であることを明らかにし、このシグナル経路を標的にすることで尿路結石に対する新たな予防・治療法の開発ができる可能性を示した。よって、これらの新しい知見を報告している本論文の筆頭著者は博士(医学)の学位を授与するに相応しいと判定した。

論文審査担当者 主査 高橋 智 副査 三好 一郎 郡 健二郎