



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	第 1012 号
氏名	藤井 泰普
授与年月日	平成 26年 3月 25日
学位論文の題名	<p>Effect of adiponectin on kidney crystal formation in metabolic syndrome model mice via inhibition of inflammation and apoptosis (アディポネクチンの抗炎症作用と抗アポトーシス作用を介したメタボリックシンドロームモデルマウスにおける腎結石形成への影響)</p> <p>PLoS One. 22; 8(4):e61343, 2013.</p>
論文審査担当者	<p>主査： 岡本 尚 副査： 高橋 智, 郡 健二郎</p>

論文内容の要旨

【背景と目的】腎結石症は、メタボリックシンドローム (MetS) 関連疾患の一つと考えられている。MetS は、肥満とインスリン抵抗性をつなぐ炎症疾患で、脂肪細胞で産生される生理活性物質であるアディポネクチン (APN) が減少し、APN により動脈硬化や心筋梗塞が改善することが報告された。これらのことを踏まえ、本研究では、MetS モデルマウスを用いて APN には腎結石形成の抑制作用があるものと考え、その抑制機序を遺伝学的に解明するため、マイクロアレイ解析による抑制関連遺伝子の同定と機能評価を行った。

【方法】①MetS モデルマウス (B6. V-Lep^{ob/ob}, ob/ob) (n=12) および対象群 (B6. V-Lep^{+/+}, +/+) (n=6) に対し、グリオキシル酸 (GOX) 50mg/kg を連日腹腔内投与した。ob/ob はさらに 2 群に分け、その 1 群に APN 0.5 μg を連日皮下投与した (ob/ob+APN) (n=6)。投与 6 日目に腎、血液および 24 時間尿を採取した。結石形成については Pizzolato 染色および偏光顕微鏡で観察し、腎断面積あたりの結石占有面積比で定量化した。②結石関連遺伝子として、結石マトリックスである secreted phosphoprotein 1; *Spp1* (osteopontin; OPN)、酸化ストレス指標である superoxide dismutase 2; *Sod2* (SOD)、単球走化性、活性化因子である Chemokine ligand 2; *Ccl2* (monocyte chemotactic protein-1; MCP-1) と *Adipoq* (APN) の腎組織発現量を定量 PCR、免疫染色および Western blotting で評価した。③腎組織から total RNA を抽出し、マイクロアレイ解析 (Gene Chip® Mouse Genome 430 2.0 Array) をした。Venn diagram を用いて MetS による腎結石の促進関連遺伝子と APN 投与による腎結石の抑制関連遺伝子を同定した。同定した遺伝子の発現を定量 PCR、免疫染色および Western blotting で評価し、さらに Gene Ontology (GO) 解析をおこなった。

【結果】①+/+ は結石形成を認めなかったが、ob/ob は結石形成を認めた (p=0.0004)。また、APN 投与により結石形成の抑制を認めた (p=0.005)。血清、尿中の結石関連物質は群間に有意差はなかった (p>0.05)。②OPN と MCP-1 は GOX 投与 6 日目の ob/ob で+/+ と比べ有意に発現増加した (p=0.02、p=0.004)。一方、SOD と APN は有意に発現低下した (p=0.008、p=0.049)。また、APN 投与による結石関連遺伝子の発現変化は認めなかった。③MetS による腎結石形成の促進関連遺伝子として 243 の遺伝子が発現低下し、259 の遺伝子が発現増加していた。これらの遺伝子の中で、特に発現の変化が著しかったのは、*Cd44* (CD44)、Lysozyme 1; *Lyz1* (LYZ1) と *Vcam1* (VCAM1) の増加 (Fold change : 13.15、15.48、17.64) と Solute carrier family 12, member 1; *Slc12a1* (SLC12A1) と Solute carrier family 7, member 13; *Slc7a13* (SLC7A13) の低下 (Fold change : 0.174、0.220) であった。さらに、これらの GO 解析では、細胞接着、炎症、免疫応答の亢進とミトコンドリア機能の低下を示した。APN による腎結石形成の抑制関連遺伝子として 154 の遺伝子が発現低下し、190 の遺伝子が発現増加していた。これらの遺伝子の中で、特に発現の変化が著しかったのは、Aurora kinase A; *Aurka* (AURKA) および Thymidine kinase 1; *Tk1* (TK1) の増加 (Fold change : 3.065、2.823) であった。さらに、これらの GO 解析では、抗炎症作用と抗アポトーシス作用を示した。

【考察・結論】私たちは、MetS では腎結石形成が促進し、APN 投与により腎結石形成が有意に抑制されることを明らかにした。また、APN による腎結石形成の抑制関連遺伝子として、*Aurka* を同定し、腎結石形成の抑制にはその抗炎症作用と抗アポトーシス作用が関与していることを明らかにした。本研究は、腎結石症の新規治療薬の開発に応用できると考えられた。

論文審査の結果の要旨

腎結石症は、メタボリックシンドローム (MetS) 関連疾患の一つと考えられている。MetS では、生理活性物質であるアディポネクチン (APN) が減少し、APN により動脈硬化や心筋梗塞が改善することが報告されている。本研究では、MetS モデルマウスを用い、マイクロアレイ解析による抑制関連遺伝子を同定し、APN による腎結石形成の抑制機構を遺伝子レベルで解析した。

MetS モデルマウス (B6.V-Lep^{ob/ob}, ob/ob) (n=12) と対象群 (B6.V-Lep^{+/+}, +/+) (n=6) に対し、グリオキシル酸 (GOX) 50mg/kg を連日腹腔内投与した。ob/ob を 2 群に分け、その 1 群に APN 0.5 μ g を連日皮下投与し (ob/ob+APN) (n=6)、6 日後に腎、血液および 24 時間尿を採取した。結石形成は Pizzolato 染色と偏光顕微鏡で観察し、腎断面積あたりの結石占有面積比で定量化した。+/+ は結石形成を認めなかったが、ob/ob は結石形成を認めた (p<0.001)。また、APN 投与により結石形成の抑制を認めた (p<0.01)。血清、尿中の結石関連物質は群間に有意差はなかった (p>0.05)。結石関連遺伝子として、結石マトリックス蛋白質 (osteopontin; OPN)、酸化ストレス指標 *Sod2* (SOD)、単球走化性活性化因子 *Ccl2* (monocyte chemotactic protein-1; MCP-1) と *Adipoq* (APN) の腎組織発現量を定量 PCR、免疫染色および Western blotting で評価した。OPN と MCP-1 は GOX 投与 6 日目の ob/ob で +/+ と比べ有意に発現増加した (p<0.05, p<0.01)。一方、SOD と APN は有意に発現低下した (p<0.01, p<0.05)。APN 投与による結石関連遺伝子の有意な発現変化はなかった。腎組織から total RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。同定した遺伝子の発現を定量 PCR、免疫染色および Western blotting で評価し、さらに Gene Ontology (GO) 解析をおこなった。MetS による腎結石形成の促進関連遺伝子として 243 個が発現低下し、259 個の発現が増加していた。これらの遺伝子の中で特に発現の変化が著しかったのは、*Cd44* (CD44)、*Lyz1* (LYZ1) と *Vcam1* (VCAM1) の増加 (それぞれ、13.2、15.5 および 17.6 倍) と Solute carrier family 12 (SLC12A1) と Solute carrier family 7, member 13; *Slc7a13* (SLC7A13) の低下 (0.174、0.220 倍) であった。すなわち、細胞接着、炎症、免疫応答の亢進とミトコンドリア機能の低下を認めた。また、APN による腎結石形成の抑制関連遺伝子として 154 と 190 の遺伝子発現がそれぞれ低下および増加していた。この中で発現変化が著しかったのは、Aurora kinase A (AURKA) と Thymidine kinase 1 (TK1) の増加 (3.1 および 2.8 倍) と signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) の低下 (0.34 倍) であった。抗炎症作用と抗アポトーシス作用を持つ遺伝子群が腎結石抑制と関連していた。

以上、本研究で、MetS では腎結石形成が促進し、APN 投与により腎結石形成が有意に抑制されることを明らかにした。また、APN による腎結石形成の抑制関連遺伝子として、*Aurka*、*Tk1*、*Stat3* を同定し、腎結石形成の抑制にはその抗炎症作用と抗アポトーシス作用が関与していることを明らかにした。これらの成果は腎結石症の新規治療薬の開発に応用できると考えられた。

審査委員会では、第 1 副査 (高橋教授) から「実験的に尿路結石を作成する条件はマウスとラットおよびヒトではどの様に異なるのか」など論文に関する 12 項目の質問、次に、主査 (岡本教授) から「腎結石と動脈硬化などとの間に多くの類似性が存在するが、腎結石に特徴的なことは何か」など 13 項目の質問があった。また、指導教授である第 2 副査 (郡教授) から「尿路結石の治療法について」など主科目を中心に 4 項目の質問があった。いずれの質問に対しても十分な回答が得られ、本論文について十分に理解するとともに、専攻分野 (腎・泌尿器科学) に関する知識を習得しているものと判断された。よって本論文の著者には博士 (医学) の学位を授与するに値すると判断した。

論文審査担当者 主査 岡本 尚 副査 高橋 智、郡 健二郎