

蔞酸カルシウム結石誘発モデルでの腎上皮細胞と 蔞酸カルシウム結晶の相互作用の検討

CRYSTAL CELL INTERACTION BETWEEN RENAL EPITHELIAL CELLS AND
CALCIUM OXALATE CRYSTALS USING THE ANIMAL MODEL FOR CALCIUM
OXALATE STONE

課題番号 (13671630)

平成 13 年度～平成 14 年度科学研究費補助金

(基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

平成 15 年 3 月

(March, 2003)

研究代表者 山口 聡

(旭川医科大学・医学部・講師)

The Principal Investigator: Satoshi Yamaguchi, M.D., D.Med.Sci.

Assistant Professor, Asahikawa Medical College

はしがき

尿路結石症の生涯罹患率（1995年）は、男性では9.0%、女性では3.8%である。言い換えると、男性11人に1人、女性26人に1人が一生の間に一度は尿路結石症に罹患する計算となり、1965年の統計（男性4.3%、女性1.8%）と比較して確実に増加している。将来的にもその罹患率は、増加傾向が続くと予測されており、その対策は急務となっている。

上部尿路結石症の中でカルシウム含有結石は80%以上を占めており、その主要な成分は蓚酸カルシウムであるが、その成因はいまだに明らかになっていない点が多い。蓚酸カルシウム結石に関する研究領域では、これまで蓚酸カルシウム結晶の成長や凝集に関して、その促進因子あるいは抑制因子に対する様々な検討がなされてきた。一方、最近では、蓚酸カルシウム結石の形成初期段階において、蓚酸カルシウム結晶とその腎上皮細胞への接着（*crystal cell interaction*）が重要なポイントと考えられるようになり、種々の手法による実験結果が報告されている。

crystal cell interaction について、われわれは、*apoptosis* 等に伴い発生する細胞膜リン脂質構成の変化、特に *phosphatidylserine* の細胞膜外方への露出に注目し、米国ウイスコンシン医科大学、Mandel 教授らの研究グループと連携の上、種々の検討を行ってきた。その結果、高蓚酸尿や蓚酸カルシウム結晶の存在により腎上皮細胞が傷害され、*phosphatidylserine* が細胞膜外方へ露出してくること、*phosphatidylserine* 自体の電荷により蓚酸カルシウム結晶が細胞に付着しやすくなることが明らかとなった。しかしこれらは、腎組織由来の様々な培養細胞を用いた *in vitro* 実験で得られた結果であり、次のステップとして、*in vivo* 実験でも同様な結果が再現されるか否かを検証する必要があると考えられた。

実験的蓚酸カルシウム結石の誘発モデル（ラット）として、蓚酸の前駆物質である Ethylene Glycol 等の投与が行われることが多く、腎結石を効率的に形成させるためには、さらに塩化アンモニウムまたはビタミンD₃ がしばしば併用される。しかし、通常の実験条件では結石形成を主眼に置くあまり、腎機能障害が必発であり、腎上皮細胞にも高度なダメージが加わっている。そのため、腎上皮細胞と蓚酸カルシウム結晶の相互作用を検討するには適当な実験系ではないものと考えられる。しかし、われわれの基礎実験において、Ethylene Glycol や塩化アンモニウムの投与量の調整により、正常腎機能を保持したまま、高蓚酸尿を誘発できることが確認されている。したがって、これらの薬剤の投与期間や投与濃度を工夫することにより、腎機能に影響を与えず、腎細胞への傷害を最小限に抑制した実験条件の確立は可能と思われる。

一方、われわれが以前から検討してきたコンドロイチンポリ硫酸 S1 分画は、*in vitro* では蓚酸カルシウム結晶に対する高度の成長抑制活性を有すること、*in vivo* では蓚酸カルシウム結石形成を抑制することが判明している（藤沢真ら、日泌尿会誌、83、1647、1992）。*crystal cell interaction* に関し、各種 glycosaminoglycan が種々の作用を及ぼすことが報告され

ており、コンドロイチンポリ硫酸についても腎上皮細胞と尿酸カルシウム結晶の接触や接着に何らかの影響を与えることが予想される。*in vitro*、*in vivo* 実験を通じ、これらの薬剤と *crystal cell interaction* の詳細が明らかとなれば、尿酸カルシウム結石の予防や治療に大きく貢献するものと考えられる。

本研究は、腎上皮細胞と尿酸カルシウム結晶との関係について、1) 従来行われていた *in vitro* の実験に加え、*in vivo* での実験系を確立すること、2) 腎上皮細胞と尿酸カルシウム結晶の接着に電荷的な影響を与えると考えられる細胞膜リン脂質、特に *phosphatidylserine* との関連を *in vivo* 実験で検証すること、3) 尿酸カルシウム結晶成長や凝集を抑制すると考えられているコンドロイチンポリ硫酸が、*crystal cell interaction* に対しても抑制効果を有するか否かを *in vivo* 実験で検討すること、を主な目的とする。

研究組織

研究代表者：山口 聡（旭川医科大学・医学部・講師）

研究協力者：八竹 直（旭川医科大学・医学部・教授）

研究協力者：加藤祐司（旭川医科大学・医学部・助手）

研究協力者：奥山光彦（遠軽厚生病院）

研究協力者：高下紀子（旭川医科大学）

交付決定額（配分額）

	直接経費	間接経費	合計
平成 13 年度	1,800	0	1,800
平成 14 年度	1,800	0	1,800
総計	3,600	0	3,600

（金額単位：千円）

研究発表

(1) 学会誌等

- ・ 山口 聡, 八竹 直:尿酸代謝と尿路結石症(総説), 痛風と核酸代謝, **26**, 1-11, 2002
- ・ 山口 聡, 八竹 直:女性診療科における主要症候・疾患の薬物療法, 2 疼痛, 4) 尿路結石症~腎・尿管結石, 産婦人科の実際, **51**, 1597-1604, 2002
- ・ Satoshi Yamaguchi, John H. Wiessner, Andrew T. Hasegawa, Linda Y. Hung, Gretchen S. Mandel and Neil S. Mandel: Calcium oxalate monohydrate crystal binding substance produced from Madin-Darby canine kidney cells. *International Journal of Urology*, **9**, 501-508, 2002
- ・ 山口 聡, 八竹 直:救急診療ガイドライン, 外来でのトリアージと救急処置, 泌尿器科的腎・尿路疾患, 尿路結石症, 救急・集中治療, **14** (臨増), 196-197, 2002
- ・ 山口 聡, 加藤祐司, 高下紀子, 中園周作, 八竹 直, 奥山光彦:シュウ酸カルシウム結石形成モデルにおける腎集合管細胞での phosphatidylserine 発現の定量的評価と apoptosis pathway への関与の検討, 日尿結石誌, **1**, 103-109, 2002
- ・ 加藤祐司, 山口 聡, 高下紀子, 八竹 直, 奥山光彦:腎上皮細胞-蓚酸カルシウム結晶相互作用におけるクエン酸・マグネシウムの効果について. 日尿結石誌, **1**, 90-92, 2002
- ・ 山口 聡, 加藤祐司, 北原克教, 高下紀子, 小野晴子, 八竹 直:微小重力環境が尿路結石形成の初期過程に影響を及ぼすか? 第 12 回短時間無重力利用に関する講演会, 講演論文集, 7-10, 2003
- ・ 加藤祐司, 玉木 岳, 徳光正行, 山口 聡, 八竹 直, 奥山光彦:短腸症候群 (short bowel syndrome) に起因した尿路結石症の 1 例. 本邦報告例の検討, 日泌尿会誌: **94**, 33-36, 2003
- ・ Satoshi Yamaguchi, Yuji Kato, Mitsuhiro Okuyama, Shigeo Kaneko, Sunao Yachiku, John H. Wiessner, Neil S. Mandel: Flowcytometric Analysis for Phosphatidylserine of the Renal Collecting Duct Cell Membrane in Experimental Calcium Oxalate Nephrolithiasis, *J Urol* **169** (Suppl.): 330, 2003
- ・ 山口 聡:衝撃波による尿路上皮細胞傷害と尿路結石再発との関連性の検討, 泌尿器外科, **16** (臨増), 2003, *in printing*
- ・ Mitsuhiro Okuyama, Satoshi Yamaguchi, Sunao Yachiku: Identification of bikunin isolated from human urine that inhibits calcium oxalate crystal growth and its localization in the kidneys. *International Journal of Urology*, **10**, 2003, *in printing*
- ・ Satoshi Yamaguchi, John H. Wiessner, Andrew T. Hasegawa, Linda Y. Hung, Gretchen S. Mandel and Neil S. Mandel: A study of rat model for calcium oxalate crystal formation without severe renal damage, *in submission*
- ・ Yuji Kato, Satoshi Yamaguchi, Sunao Yachiku, Shusaku Nakazono, Juun-ichi Hori, Naoki Wada, and Kyokushin Hou: Oral administration of potassium - sodium citrate with magnesium oxide prevents recurrent urolithiasis, *in submission*

(2) 口頭発表

- 山口 聡, 奥山光彦, 八竹 直, John H. Wiessner, Andrew T. Hasegawa, Neil S. Mandel : 蔞酸カルシウム結石形成における細胞-結晶間相互作用の *in vivo* 実験に適したモデルの検討, 第 89 回日本泌尿器科学会総会 (2001 年 4 月 15 日, 兵庫県神戸市)
- 山口 聡, 加藤祐司, 八竹 直, 奥山光彦, John H. Wiessner, Andrew T. Hasegawa, Neil S. Mandel : Crystal-cell interaction の *in vivo* 実験に適した蔞酸カルシウム結石実験モデルの検討, 第 11 回日本尿路結石症研究会 (2001 年 8 月 31 日, 兵庫県宝塚市)
- 加藤祐司, 山口 聡, 八竹 直, 吉原秀樹, 奥山光彦 : マグネシウム製剤による尿中結石関連物質の健常者での検討, 第 11 回日本尿路結石症研究会 (2001 年 8 月 31 日, 兵庫県宝塚市)
- 加藤祐司, 山口 聡, 岩田達也, 玉木 岳, 八竹 直, 川上憲裕, 倉 達彦 : マグネシウム製剤投与による尿中結石関連諸物質の変化の検討, 第 353 回日本泌尿器科学会北海道地方会 (2001 年 9 月 22 日, 旭川市)
- 加藤祐司, 山口 聡, 岩田達也, 八竹 直, 奥山光彦, 倉 達彦, 国枝 学, 小山内裕昭 : マグネシウム製剤投与による尿中結石関連諸物質の変化の検討, 第 66 回日本泌尿器科学会東部総会 (2001 年 10 月 11 日, 東京都)
- 山口 聡, 加藤祐司, 高下紀子, 和田直樹, 八竹 直, 奥山光彦 : シュウ酸カルシウム結石形成モデルにおける腎集合管細胞での phosphatidylserine 発現とその定量的評価の検討, 第 90 回日本泌尿器科学会総会 (2002 年 4 月 16 日, 東京都)
- 加藤祐司, 山口 聡, 高下紀子, 岩田達也, 八竹 直, 奥山光彦, 西原正幸 : 腎上皮細胞-蔞酸カルシウム結晶相互作用におけるクエン酸・マグネシウムの効果について, 第 90 回日本泌尿器科学会総会 (2002 年 4 月 18 日, 東京都)
- 加藤祐司, 山口 聡, 高下紀子, 岩田達也, 八竹 直, 奥山光彦 : 腎上皮細胞-蔞酸カルシウム結晶相互作用におけるクエン酸・マグネシウムの効果について, 日本尿路結石症学会第 12 回学術集会 (2002 年 8 月 30 日, 旭川市)
- 山口 聡, 加藤祐司, 高下紀子, 中園周作, 八竹 直, 奥山光彦 : シュウ酸カルシウム結石形成モデルにおける腎集合管細胞での phosphatidylserine 発現の定量的評価と apoptosis pathway への関与の検討, 日本尿路結石症学会第 12 回学術集会 (2002 年 8 月 30 日, 旭川市)
- 山口 聡 : 衝撃波による尿路上皮細胞傷害と尿路結石再発との関連性の検討, 第 67 回日本泌尿器科学会東部総会 (2002 年 9 月 20 日, 東京都)
- 山口 聡 : 衝撃波による尿路上皮細胞傷害と衝撃波が crystal-cell interaction におよぼす影響の検討, 第 67 回日本泌尿器科学会東部総会 (2002 年 9 月 20 日, 東京都)
- 山口 聡 : Microgravity が Crystal-cell interaction に及ぼす影響～地下無重力実験センターにおける検討, 第 3 回ウインターリサーチカンファレンス (2003 年 1 月 10 日, 旭川市)
- 山口 聡, 加藤祐司, 北原克教, 高下紀子, 小野晴子, 八竹 直 : 微小重力環境が尿路結石形成の初期過程に影響を及ぼすか? 第 12 回短時間無重力利用に関する講演会 (2003 年 3 月 5 日, 札幌市)

- ・ 山口 聡, 八竹 直: 尿路結石形成の初期段階にかかわる *crystal-cell interaction* の *in vivo* 実験とその応用, 第 91 回日本泌尿器科学会総会 (2003 年 4 月 5 日, 徳島市)
- ・ Satoshi Yamaguchi, Yuji Kato, Mitsuhiro Okuyama, Shigeo Kaneko, Sunao Yachiku, John H. Wiessner, Neil S. Mandel.: Flowcytometric Analysis for Phosphatidylserine of the Renal Collecting Duct Cell Membrane in Experimental Calcium Oxalate Nephrolithiasis, 98th Annual Meeting of American Urological Association, Chicago, April, 2003

(3) 出版物

- ・ ガイドライン作成委員会: 荒川 孝, 五十嵐辰男, 井口正典, 伊藤晴夫, 小川由英, 金村三樹郎, 守殿貞夫, 郡 健二郎, 棚橋善克, 丹田 均, 寺井章人, 西尾俊治, 奴田原紀久雄, 秦野 直, 東原英二, 東 義人, 平尾佳彦, 間宮良美, 麦谷荘一, 村井 勝, 森本鎮義, 八竹直, 山口秋人, 山口 聡: 尿路結石症診療ガイドライン (日本泌尿器科学会, 日本 Endourology・ESWL 学会, 日本尿路結石症学会編), 金原出版, 東京, 2002

研究成果

I 平成 13 年度の研究実績概要

平成 13 年度は、尿酸カルシウム結晶と腎上皮細胞の相互作用の検討に適したラット尿酸カルシウム結石誘発モデルの確立を試みた。

雄性 SD ラット(6 週齢)に対し、以下の条件の溶液を各々の期間、自由摂水させた。

実験 1: Ethylene Glycol (EG)+1.0%塩化アンモニウム (NH_4Cl) (5, 7, 9, 11, 13 日間)

実験 2: EG 単独 (7, 14, 21, 28 日間)

EG 濃度は、各々の実験で 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 vol.%の 4 群を設定)。それぞれ投与期間別に、各種尿・血液生化学検査、尿中尿酸カルシウム結晶と腎組織内尿酸カルシウム結晶の沈着について検討した。

結果: 実験 1; EG 濃度と投与期間に依存して、尿中尿酸排泄量、尿酸カルシウム (1 水和物(COM)+ 2 水和物(COD)) 結晶形成と腎組織内尿酸カルシウムの沈着は増加していたが、平行して腎機能障害および尿細管障害が進行していた。実験 2; 実験 1 に比し、尿酸カルシウム結晶 (COD中心) 形成と腎組織内尿酸カルシウムの沈着は少なかったが、腎尿細管障害はほとんど認めなかった。

以上より、従来の *in vivo* 実験系を modify することにより、腎障害を最小限に抑制し、かつ尿酸カルシウムの結晶尿のみを惹起させる条件の設定は可能と考えられた。その critical point として、実験 1 では 0.1-0.2% EG+1.0% NH_4Cl , day 9 まで、実験 2 では 0.4% EG, day 14 以降、が適当と思われた。さらに実験条件の微調整により尿路上皮に異なる種類の結晶 (COD, COM) を曝露できる可能性がある。これらを応用することで、これまで *in vivo* 実験で得られている細胞結晶間相互作用に関する研究の *in vivo* での再現あるいは追試が可能となった。

II 平成 14 年度の研究実績概要

平成 14 年度は、平成 13 年度に確立された尿酸カルシウム結晶と腎上皮細胞の相互作用の検討に適したラット尿酸カルシウム結石誘発モデルを利用して、①尿酸カルシウム結晶に曝露された腎集合管細胞膜の検討、②コンドロイチンポリ硫酸の腎上皮細胞と尿酸カルシウム結晶の接着抑制効果の検討、をおこなった。

① 尿酸カルシウム結晶に曝露された腎集合管細胞膜の検討：

尿酸カルシウム結晶が出現する条件下での、腎集合管細胞膜上のリン脂質 (phosphatidylserine) の分布変化を観察した。細胞膜外方の phosphatidylserine の露出については、phosphatidylserine に特異的に結合する annexin V による免疫組織化学的検討と 2-color flowcytometry による定量的評価を行った。その結果、尿中尿酸排泄量や尿酸カルシウム結晶の増加に伴い、細胞膜表面に phosphatidylserine が発現している細胞が徐々に増加することが確認された。この変化に大きく関与する apoptosis 細胞内情報伝達系のうち、caspase 3, 8, 9 を検討したところ、その活性についても、尿中尿酸排泄量や尿酸カルシウム結晶の増加に伴い、徐々に増加していた。

② コンドロイチンポリ硫酸の腎上皮細胞と尿酸カルシウム結晶の接着抑制効果の検討：

①と同様な実験条件下で、ラットにコンドロイチンポリ硫酸を投与した (3mg/100g、皮下注)。腎集合管細胞について①と同様に、細胞膜外方の phosphatidylserine の露出および caspase 3, 8, 9 を検討したところ、いずれも非投与群に比し、抑制される傾向を示した。

これらの結果から、*in vivo* 実験においても、微小細胞傷害による crystal-cell interaction への影響が、定量的に分析できることが明らかとなった。尿酸カルシウム結晶により生じる腎集合管細胞の微小傷害は、コンドロイチンポリ硫酸によりコントロールされ、最終的には結石形成が抑制される可能性がある。本研究結果を応用することにより、尿酸カルシウム結晶や高尿酸尿以外の要因による腎上皮細胞傷害の検討も可能であり、種々の結石促進物質や抑制物質の評価にも有用と考えられる。

Summary

In 2001, a study was conducted to establish a model of renal stones induced by calcium oxalate that would be suitable for investigating crystal-cell interactions between calcium oxalate crystals and renal epithelium. In that study, it was possible to determine conditions under which calcium oxalate crystaluria can be induced while minimizing renal injury, by adjusting the conditions used in conventional *in vivo* experiments. More specifically, it seemed to be suitable to administer 0.1-0.2 % ethylene glycol plus 1.0 % ammonium chloride for 9 days or 0.4 % ethylene glycol alone for 14 days. In addition to the studies of crystal-cell interactions conducted *in vitro*, determination of these conditions made it possible to endorse *in vivo* experiment.

In 2002, the following two experiments were carried out.

Experiment 1: A study on the cell membrane of the renal collecting duct cells exposed to calcium oxalate crystals.

Under conditions inducing the formation of calcium oxalate crystals, changes in the distribution of phosphatidylserine on the cell membrane of the renal collecting duct cells were examined by flowcytometry and fluorescent microscope. It was confirmed that phosphatidylserine expressing cells gradually increased with urinary excretion of oxalate and calcium oxalate crystals. Caspase family, one of the intracellular signal transduction systems for apoptosis, was also activated.

Experiment 2: Effects on chondroitin polysulfate to prevent the adhesion of calcium oxalate crystals to the renal epithelial cells.

When rats were treated with chondroitin polysulfate under the same conditions as Experiment 1, phosphatidylserine exposure on the renal collecting duct cells and the activities of caspase 3, 8, and 9 tended to be suppressed comparing to the untreated control groups.

These results indicate that the effects of mild cell injury on crystal-cell interactions can be quantitatively analyzed by *in vivo* experiment. It seems likely that the small injury of the renal collecting duct cells caused by calcium oxalate crystals can be controlled by chondroitin polysulfate, leading to suppression of stone formation.

主要発表論文

- 1) Satoshi Yamaguchi, John H. Wiessner, Andrew T. Hasegawa, Linda Y. Hung, Gretchen S. Mandel and Neil S. Mandel :
Calcium oxalate monohydrate crystal binding substance produced from Madin-Darby canine kidney cells.
International Journal of Urology, **9**, 501-508, 2002
- 2) Mitsuhiro Okuyama, Satoshi Yamaguchi, Sunao Yachiku :
Identification of bikunin isolated from human urine that inhibits calcium oxalate crystal growth and its localization in the kidneys.
International Journal of Urology, **10**, 2003, *in printing*
- 3) Satoshi Yamaguchi, John H. Wiessner, Andrew T. Hasegawa, Linda Y. Hung, Gretchen S. Mandel and Neil S. Mandel :
A study of rat model for calcium oxalate crystal formation without severe renal damage.
in submission
- 4) Yuji Kato, Satoshi Yamaguchi, Sunao Yachiku, Shusaku Nakazono, Juun-ichi Hori, Naoki Wada, and Kyokushin Hou :
Oral administration of potassium - sodium citrate with magnesium oxide prevents recurrent urolithiasis.
in submission
- 5) Satoshi Yamaguchi, Yuji Kato, Mitsuhiro Okuyama, Shigeo Kaneko, Sunao Yachiku, John H. Wiessner, Neil S. Mandel :
Flowcytometric Analysis for Phosphatidylserine of the Renal Collecting Duct Cell Membrane in Experimental Calcium Oxalate Nephrolithiasis.
J Urol, **169** (Suppl.), 330, 2003
- 6) 山口 聡, 八竹 直 :
尿酸代謝と尿路結石症 (総説)
痛風と核酸代謝, **26**, 1-11, 2002
- 7) 山口 聡, 加藤祐司, 高下紀子, 中園周作, 八竹 直, 奥山光彦 :
シュウ酸カルシウム結石形成モデルにおける腎集合管細胞での phosphatidylserine 発現の定量的評価と apoptosis pathway への関与の検討
日尿結石誌, **1**, 103-109, 2002
- 8) 加藤祐司, 山口 聡, 高下紀子, 八竹 直, 奥山光彦 :
腎上皮細胞-蓚酸カルシウム結晶相互作用におけるクエン酸・マグネシウムの効果について
日尿結石誌, **1**, 90-92, 2002
- 9) 山口 聡, 加藤祐司, 北原克教, 高下紀子, 小野晴子, 八竹 直 :
微小重力環境が尿路結石形成の初期過程に影響を及ぼすか?
第12回短時間無重力利用に関する講演会, 講演論文集, 7-10, 2003
- 10) 加藤祐司, 玉木 岳, 徳光正行, 山口 聡, 八竹 直, 奥山光彦 :
短腸症候群 (short bowel syndrome) に起因した尿路結石症の1例. 本邦報告例の検討
日泌尿会誌, **94**, 33-36, 2003