

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

日本尿路結石症学会誌 (2004.11) 3巻2号:37～42.

微小重力環境下での腎上皮細胞に対する微小細胞傷害の検討

山口 聡, 奥山光彦, 北 雅史, 加藤祐司, 北原克教, 金子  
茂男, 八竹 直, 高下紀子

## ◆Session 2-1

## 微小重力環境下での腎上皮細胞に対する 微小細胞傷害の検討

旭川医科大学医学部泌尿器科

山口 聡、奥山 光彦、北 雅史、加藤 祐司  
北原 克教、金子 茂男、八竹 直、高下 紀子



Dr. Yamaguchi

### 背景と目的(1)

- 1 健康状態に問題ない宇宙飛行士においても、フライト中、フライト後に少なくとも14名の尿路結石のepisodeが報告されている。
- 2 国際宇宙ステーションや有人惑星探査など、微小重力環境での長期滞在中に尿路結石症に罹患する可能性は十分にある。
- 3 宇宙飛行士(Space Shuttle, Mir)の検討により、尿量低下や骨量低下による高カルシウム尿などが、結石の危険因子となると考えられている。

### 背景と目的(2)

- 4 しかし、微小重力下の尿路結石形成の初期過程についての基礎的検討はほとんど行われていない。
- 5 結石の形成には、結晶の成長に加え、結晶と腎上皮細胞の相互作用(crystal cell interaction)が重要視されている。
- 6 その過程には細胞への微小傷害の関与が考えられ、腎尿管細胞を用いた短時間微小重力実験により、細胞傷害が発生するか否かについて検討した。

#### ▲【スライド1, 2】

##### 背景と目的

尿路結石症は、近年増加傾向にあり、本邦の統計では、その生涯罹患率は男性9.0%、女性3.8%である。言い換えれば、男性では11人に1人、女性では26人に1人が一生に一度は尿路結石症に罹患することになる<sup>1)</sup>。

厳しい訓練を受け、健康状態に全く問題のない宇宙飛行士にとっても例外ではなく、宇宙飛行中または宇宙飛行後に少なくとも14名の尿路結石症の発症が確認されている<sup>2)</sup>。その原因として、Mir (Russia)<sup>2)</sup>やSpace Shuttle (NASA, USA)<sup>3)</sup>に搭乗した宇宙飛行士の詳細な尿の分析により、短期間あるいは長期間の微小重力環境への曝露が、尿量減少や種々の結石関連物質の変化を招き、尿路結石症の危険因子となる可能性が示されている。

しかし、微小重力下の尿路結石形成の初期過程についての基礎的検討はほとんど行われておらず、唯一、宇宙飛行士の尿中 osteopontin の検討<sup>4)</sup>がなされているに過ぎない。現在建設中の国際宇宙ステーションが完成し、微小重力環境下での長期滞在が可能となれば、その期間中に尿路結石症に罹患する可能性は十分にあり、微小重力と尿路結石発生との関係をあらかじめ追究しておくことは重要と思われる。

一方、尿路結石形成の初期段階において、その主要成分である尿酸カルシウムなどの微小結晶と腎上皮細胞の相互作用 (crystal cell interaction) が重要視され、その過程には細胞の微小傷害が関与すると考えられている<sup>5, 6)</sup>。われわれは、種々の条件下に腎尿管細胞を短時間の微小重力状態に置くことで、crystal cell interaction や細胞の微小傷害に何らかの影響がもたらされるのではないかと考え、以下の研究を行った。

### 実験の概要

- \* 尿酸は、尿路結石の主要成分である。
- \* 尿酸自体が尿路上皮細胞へ微小細胞傷害を惹起させる。→新たな結石形成の場となる。

### 実験のポイント

- 1 微小重力環境が腎上皮細胞に何らかの傷害を与えるか？
- 2 種々の濃度の尿酸に曝露された腎上皮細胞が、微小重力環境下でどの程度傷害されるか？

#### ▲【スライド3】

##### 方法

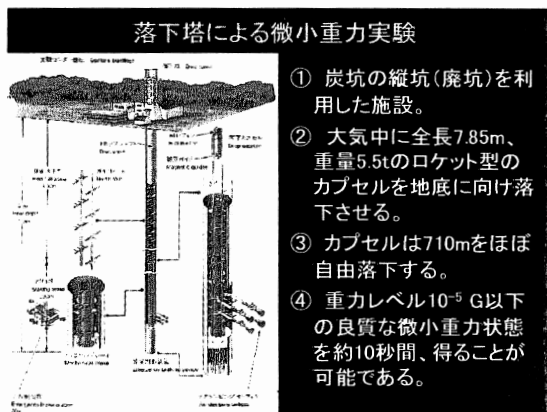
- 1) 実験の概要：尿酸は、尿路結石形成に大きく関わっている物質である。尿酸そのものが尿路結石形成の主要成分であるとともに、高濃度の尿酸が尿路上皮細胞への微小細胞傷害を惹起させ、それが新たな結石形成の場となることが知られている。本実験は、①微小重力環境が腎上皮細胞に何らかの傷害を与えるか、②

種々の濃度の蔞酸に曝露された腎上皮細胞が、微小重力環境下でどの程度傷害されるか、を検討するものである。



▲【スライド4】

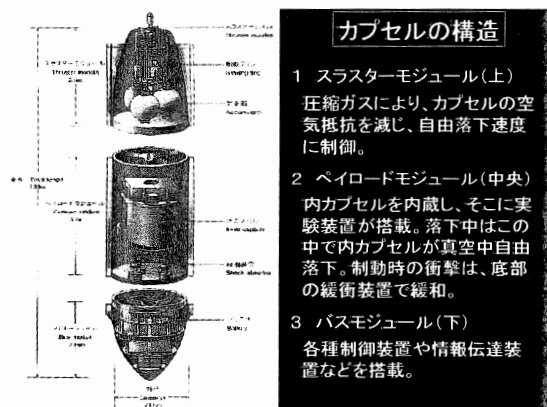
2) 微小重力実験：以下の実験は、北海道上砂川町の(株)地下無重力実験センターで行った。



▲【スライド5】

炭坑の縦坑を利用したこの施設は、以下の手順により、落下塔 (drop tower) による微小重力実験が可能である。

①大気中に全長7.85m、重量5.5tのロケット型のカプセルを地底に向け落下させる。②カプセルは710mをほぼ自由落下する。③その結果、重力レベル $10^{-5}G$ 以下の良質な微小重力状態を約10秒間、得ることが可能である。



▲【スライド6】

一方、落下カプセルは、以下の3つのモジュールから構成されている。①スラスターモジュール：カプセルは空気抵抗を受けるため、圧縮ガスを噴射し、ほぼ自由落下速度に制御する部分。②ペイロードモジュール：円筒状の内カプセルを内蔵、内カプセルの中は大気圧で、実験装置を搭載している部分。内カプセルは落下前は天井に吊られ、落下中はこの中で真空中自由落下する。底部の緩衝装置で内カプセルの制動時の衝撃を緩和している。③バスモジュール：制御装置、バッテリー、カラー画像伝送、光伝送装置等、電気機器を搭載する部分。

方法

1 腎尿細管細胞 (Madin-Darby Canine Kidney: MDCK細胞) を培養、incubator (37°C) 内に置き、ビデオカメラや電力供給装置とともに実験カプセルに搭載、落下実験に供した。

2 実験条件

Group 1: Microgravity (MG) alone

Group 2: MG + NaOx (1.25mM) for 120min.

Group 3: MG + NaOx (2.5mM) for 120min.

Group 4-6: Control (1.0G) vs Group 1-3

(NaOx; sodium oxalate)

▲【スライド7】

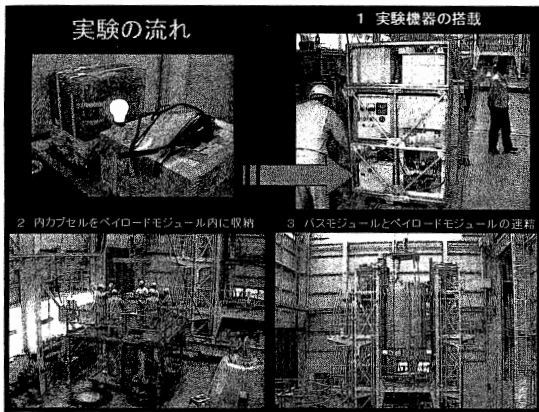
3) 細胞培養：イヌの遠位尿細管由来の細胞である Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞 (NBL-2, ATCC) を用いた。10%FBS添加培養液 (DMEM+1% fungizone+0.5%PCG+0.5%SM) を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> (95%air) incubator 内で、75cm<sup>2</sup> flask (Iwaki Co, Ltd.), 25cm<sup>2</sup> flask (Nunc™), 10cm culture dish (Nunc™), 12well plate (Coaster®) 内の15mm coverslip および Transwell® (Coaster®) に、confluent に達するまで培養した。

4) 実験条件：微小重力群 (MG: Group 1-3) と地上コントロール群 (1G: Group 4-6) の比較検討を行った。細胞傷害を惹起させる物質として、蔞酸ナトリウム (NaOx) を用いた。



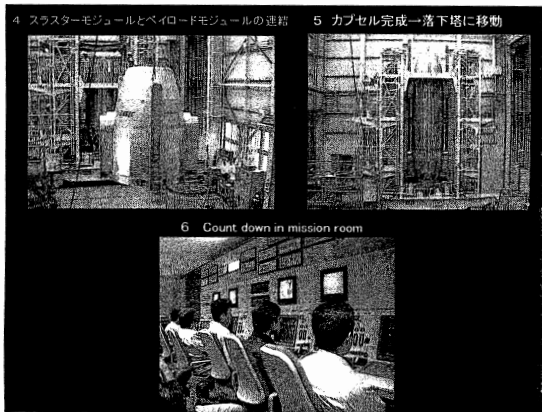
▲【スライド8】

5) 微小重力実験装置：MDCK 細胞を上記実験条件に調整し、Group 1 - 3 の培養細胞を簡易 incubator (SB-100, AS ONE Co, Ltd.) 内に収納、電源供給装置と記録装置 (照明とビデオカメラ) とともに実験ラック (横 1/4) に搭載した。Incubator は電源供給装置により 37°C (room air) に保ち、実験内容はデジタルビデオカメラレコーダー (Sony DCR-TRV50) で記録した。実際の実験の流れは、以下の要領である。



#### ▲【スライド9】

①本実験装置を他の実験者の装置とともにラック内に搭載する。②内カプセルをペイロードモジュール内に収納する。③バスモジュールとペイロードモジュールを連結する。



#### ▲【スライド10】

④スラスターモジュールとペイロードモジュールを連結する。⑤カプセルが完成し、落下塔に移動する。⑥スタッフはミッションルームに移動し、各種モニター監視の下、カウントダウンをおこなう。⑦落下の様子をモニターで確認、約1時間後にカプセル内から装置を回収し、実験に供した。

### 検討項目

・細胞微小傷害の有無について、  
微小重力群と地上コントロール群を比較

- 1 透過型電子顕微鏡 (TEM) 所見
- 2 細胞間電気抵抗 (TEER) の測定
- 3 細胞膜リン脂質構成の変化 (蛍光顕微鏡)  
(細胞膜外方への phosphatidylserine: PS の露出)
- 4 early apoptosis pathway の検討  
(caspase 3 activity)

#### ▲【スライド11】

6) 検討項目：MDCK 細胞の細胞微小傷害の有無について、形態学的、生化学的、電気生理学的に検討し、各々を微小重力群とコントロール群で比較した。

①透過型電子顕微鏡 (TEM) での検討：Transwell® を回収後、polycarbonate membrane を速やかに 2% GA + 2% PFA + 0.1M PB で固定した。1% OsO<sub>4</sub>, 7.5% sucrose, ethanol, propylene oxide にて処理後、Epon 包埋、超薄切し、観察した。

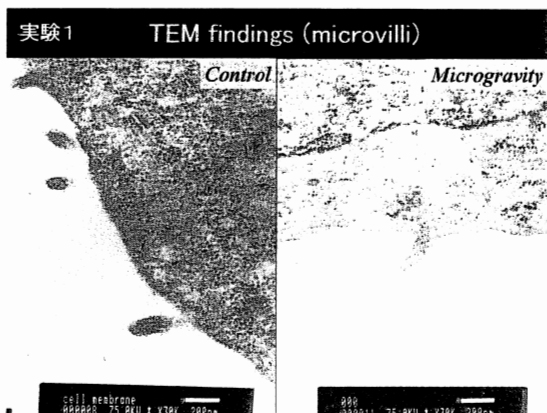
②細胞間電気抵抗 (Trans epithelial electrical resistance; TEER) の変化：EVOMX, STX2, EndOhm (World Precision Instrument, Inc.) を用い、Transwell® 内の TEER を測定した。

③細胞膜リン脂質構造の変化 (早期 apoptosis による変化である細胞膜外方への phosphatidylserine の露出) の検討：15mm coverslip を MEBCYTO apoptosis kit (MBL) を用い、phosphatidylserine を特異的に認識する annexin V-FITC を反応させた。Propidium iodide との二重染色の後、蛍光顕微鏡でこれらの局在を観察した。

④細胞内 apoptosis pathway の変化 (Caspase 3 activity) の検討：75cm<sup>2</sup> flask, 25cm<sup>2</sup> flask, 10cm culture dish 内の細胞を cell scraper にて回収、Caspase colorimetric protease assay kit (MBL) を用い、microplate reader (405nm) で Caspase 3 activity を測定した。

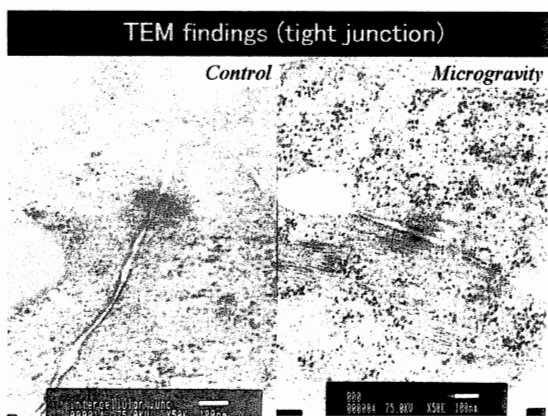
#### 結果

- 1) 透過型電子顕微鏡 (TEM) 所見



▲【スライド12】

①微絨毛 (microvilli) の変化: TEMでの微小重力曝露前(左)、曝露後(右)のmicrovilliの変化は認めなかった。



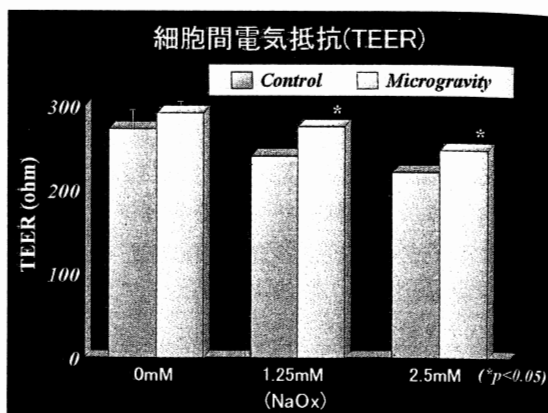
▲【スライド13】

②細胞接合部 (tight junction) の変化: TEMでの微小重力曝露前(左)、曝露後(右)のtight junctionの変化は認めなかった。



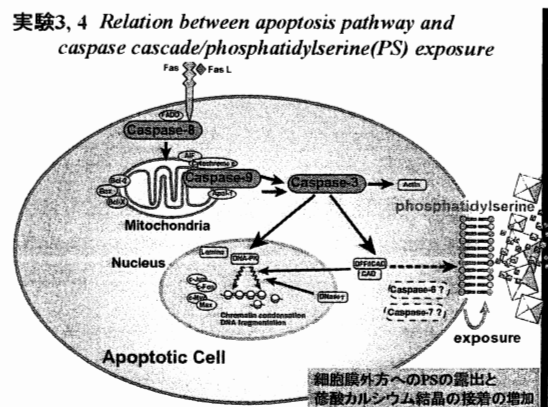
▲【スライド14】

2) 細胞間電気抵抗 (TEER) の変化  
細胞間電気抵抗は、EVOM, EndOhmを用い、MDCK細胞を confluent になるまで培養した Transwell®内 で測定した。



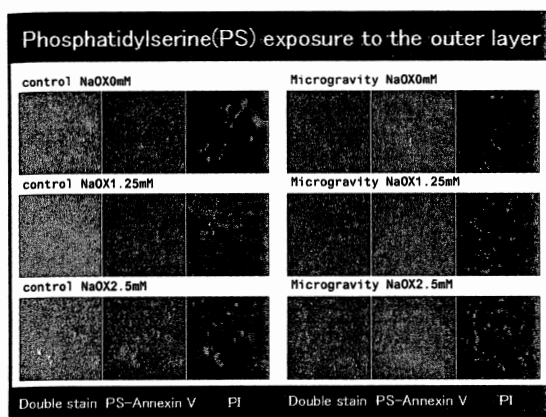
▲【スライド15】

NaOx 曝露後の TEER は、地上コントロール群に比し、微小重力群では有意に高値を示していた。すなわち微小重力群では、NaOx による細胞間の接着に関わるダメージが少ないものと考えられた。



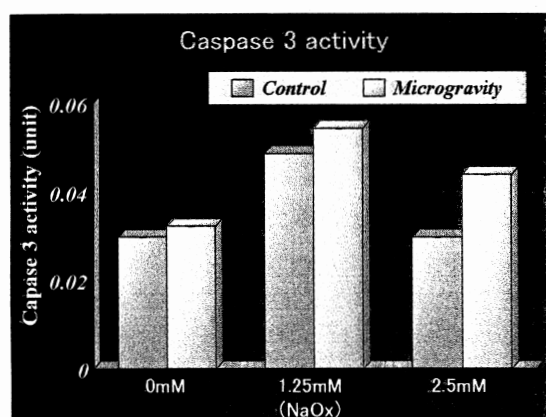
▲【スライド16】

3) 細胞膜リン脂質構造の変化  
早期 apoptosis における phosphatidylserin の細胞膜外方への露出と caspase の関係 ; apoptosis 細胞内情報伝達系では、caspase3, 8, 9が phosphatidylserin の露出に関与している。phosphatidylserin は強い陰性荷電を有し、蔭酸カルシウム結晶が引きつけられ、接着しやすくなる。この変化が結石形成の初期段階に重要と考えられている。



#### ▲【スライド17】

地上コントロール群、微小重力群ともに、NaOxの濃度依存性に細胞傷害を受け、細胞膜外方への phosphatidylserine の露出 (apoptosis; annexin V-FITC との結合の増加) および細胞核の propidium iodide (PI) 陽性所見の増加 (necrosis) が確認された。しかし、両群の蛍光染色態度や染色局在の差は認めなかった。



#### ▲【スライド18】

#### 4) 細胞内 apoptosis pathway の変化

Caspase 3 activity は、NaOx1.25mM で最大に達し、NaOx2.5mM ではむしろ減少していた。地上コントロール群に比し、微小重力群では全体に高値を示していた。

#### まとめ

- 1 細胞微細構造や細胞膜リン脂質構成には微小重力群とコントロール群との差を認めなかった。
- 2 シュウ酸曝露による細胞間電気抵抗の検討では、微小重力群での細胞同士の結合が、より強固であると考えられた(結晶が付着しにくい)。
- 3 シュウ酸曝露によるapoptosis誘発の検討では微小重力群でearly apoptosis pathwayが亢進している傾向を示した(結晶が付着しやすい)。
- 4 微小重力下での結石形成に関わる細胞傷害の反応は、細胞レベルでは複雑であることが推定された。

#### ▲【スライド19】

#### まとめ

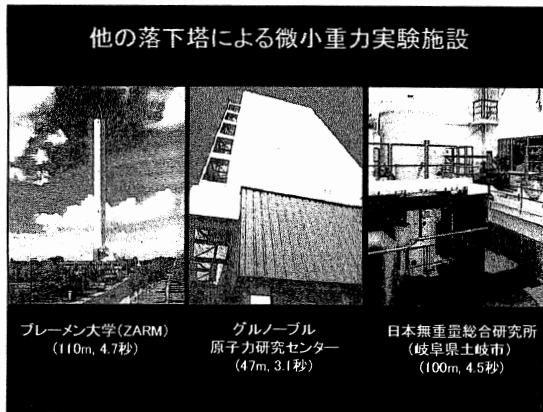
透過型電子顕微鏡による腎上皮細胞の形態学的検討では、微小重力群と地上コントロール群との差は認められなかった。また、シュウ酸カルシウム結晶の接着に重要な細胞膜リン脂質構造の変化(細胞膜外方への phosphatidylserine の露出)も両者に差を認めず、これはNaOx曝露による細胞傷害実験においても同様であった。しかし、細胞内 apoptosis pathway の検討では、NaOx曝露により微小重力群で caspase 3 activity が高い傾向を示し、微小重力群で apoptosis が亢進している可能性がある。一方、細胞間電気抵抗 (TEER) は、微小重力群では、特にNaOx曝露実験において有意に高値を示しており、微小重力群における細胞間の接着がより強固なものであると考えられた。微小重力群での apoptosis 亢進の所見は、尿路結石形成についてはそれを促進する方向に、TEERの高値は、尿路結石形成についてはそれを抑制する方向に働くと考えられる。従って、微小重力下での尿路結石形成に関わる細胞傷害反応は、複雑であることが予想された。

#### 今後の展望

- 1 残念ながら地下無重力実験センターは、2003年度に廃止されたが、微小重力環境での尿路結石症に関するデータが殆どないという現状からは、その関心は維持すべきである。
- 2 短時間微小重力実験による尿路結石形成の初期段階についての検討には問題点も多いが、その基礎データを集積する意義はあると考えられる。
- 3 今後、これらの実験の質と精度を上げ、より長時間の微小重力実験(パラボリック飛行やSpace Shuttle搭載実験)への移行も可能と思われる。

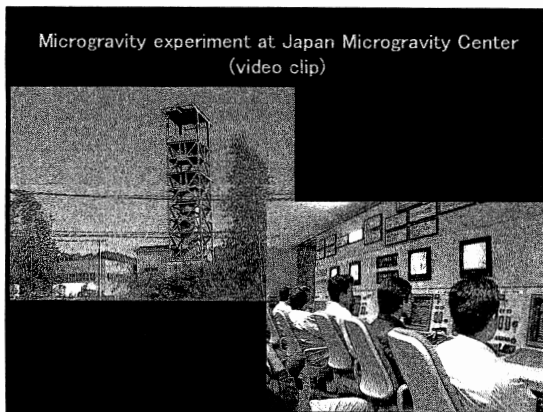
#### ▲【スライド20】

今後の展望としては以下の点が挙げられる。①残念ながら地下無重力実験センターは、2003年度に廃止されたが、微小重力環境での尿路結石症に関するデータが殆どないという現状からは、その関心は維持すべきである。②短時間微小重力実験による尿路結石形成の初期段階についての検討には問題点も多いが、その基礎データを集積する意義はあると考えられる。③今後、これらの実験の質や精度を上げ、さらに宇宙開発事業団やNASAが推進する宇宙医学プロジェクトの一つとして、微小重力環境下での尿路結石症への関心が高まれば、より長時間の微小重力実験(パラボリック飛行やSpace Shuttle搭載実験など)への移行も可能となるとと思われる。



▲【スライド21】

他の落下塔による微小重力実験施設を示す。現在、稼働中の施設としては、ドイツ、フランス、日本では岐阜県土岐市にありますが、その規模は、地下無重力実験センターに比し、かなり小さいものである。微小重力持続時間も半分以下であるため、国際的に見ても本実験センターの稼働中止は本当に惜しいの一言につきる。



▲【スライド22】

最後に、今回の実験風景についてビデオクリップで示した。

謝辞

本研究は、(財)北海道科学技術総合振興センターの助成によって行われた。また微小重力実験の遂行にあたり、北海道マイクログラビティー研究会のご支援ならびに(株)地下無重力実験センター関係者の皆様のご協力に深く感謝の意を表す。

参考文献

- 1) ガイドライン作成委員会：尿路結石症の疫学、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、pp17-21、2002.
- 2) Whitson PA, Pietrzyk RA, Morukov BV, Sams CF. The risk of renal stone formation during and after

long duration space flight. *Nephron* 89:264-70, 2001.

- 3) Whitson PA, Pietrzyk RA, Pak CY. Renal stone risk assessment during Space Shuttle flights. *J Urol*, 158: 2305-2310, 1997.
- 4) Hoyer JR, Pietrzyk RA, Liu H, Whitson PA. Effects of microgravity on urinary osteopontin. *J Am Soc Nephrol* 10: S389-393, 1999.
- 5) Wiessner JH, Hasegawa AT, Linda YH, Mandel NS. Oxalate-induced exposure of phosphatidylserine on the surface of renal epithelial cells in culture. *J Am Soc Nephrol* 10: S441-445, 1999.
- 6) Wiessner JH, Hasegawa AT, Hung LY, Mandel GS, Mandel NS. Mechanisms of calcium oxalate crystal attachment to injured renal collecting duct cells. *Kidney Int* 59: 637-644, 2001.