

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10627

研究課題名(和文) 尿路結石のミトコンドリア傷害機序の病態解明と網羅的遺伝子探索による予防法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the pathology of mitochondrial injury during urinary calculi formation and development of prevention.

研究代表者

安井 孝周 (YASUI, TAKAHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40326153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：1. 腎尿細管細胞のミトコンドリア傷害に着目した治療薬とバイオマーカーの開発：Cyclophilin D (cypD) のノックアウトマウスにシュウ酸前駆物質を投与し、結石の形成および細胞内の分子機構を解明した。wild typeと比較し、CypDノックアウトマウスでは、ミトコンドリア傷害、結石形成量が少なかった。

2. 新規関連遺伝子の同定とリスク診断法の開発：網羅的なヒトゲノムワイド関連解析で同定した遺伝子領域から発症リスク診断法の確立を試みた。マルチプレックス解析システムを使用して関連遺伝子を検討した。健常者でM1マクロファージ関連物質が低下し、結石患者でM2マクロファージ関連物質が低下した。

研究成果の概要(英文)：(1) Development of medicine and biomarkers focusing on the mitochondrial injury of renal tubule cells.:The oxalic acid precursor was administered to the knockout mouse of Cyclophilin D (cypD), and the formation of stone and the molecular mechanism were elucidated. Compared to in wild-type, mitochondrial injury and stone formation were small in CypD knockout mice. (2) Identification of new related genes and development of risk diagnosis method.:We tried to establish a diagnosis method of onset risk from the gene region identified by comprehensive human genome-wide association analysis. The related genes were examined using a multiplex analysis system. M1 macrophage-related substances decreased in healthy subjects and M2 macrophage-related substances decreased in stone patients.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：尿路結石 酸化ストレス ミトコンドリア マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

わが国の尿路結石の生涯罹患率は急増し、男性では100人中15人にまで達していることから、その成因の究明と再発予防法の確立は急務である。これまでは結石成分の90%以上を占める無機物質を対象に予防法が行われてきた。しかし、5年再発率は50%と高く、無機物質を対象とした研究、予防法には限界があると考え、有機物質からの研究を進めてきた。その成果から、尿路結石の形成初期にはシュウ酸による細胞傷害、ミトコンドリア傷害、活性酸素の発生亢進、細胞傷害のサイクルが発生し、有機物質(マトリックス)であるオステオポンチン(OPN)が発現したのち、結石形成に至る分子機序を明らかにした。この形成初期の分子機構を解明し、予防薬の開発につなげることを着想した。さらに、尿路結石になりやすい遺伝要因について、網羅的なゲノムワイド関連解析の成果を進展させ、尿路結石のリスク診断法の開発を試みたいと考えた。

2. 研究の目的

尿路結石は、遺伝因子に環境因子が作用して発症する多因子疾患である。私たちは遺伝因子として、ヒトゲノムワイド関連解析(GWAS)により尿路結石に関連する新たな遺伝子領域を発見した。また環境因子として、腎尿細管細胞のミトコンドリア傷害による細胞傷害から、結石形成がはじまることを見いだした。

本研究では、以下の2つの観点から予防法を開発することを目的とした。

(1)ミトコンドリア傷害に着目した治療薬とバイオマーカーの開発: 尿路結石形成におけるミトコンドリア傷害の分子機構を解明し、予防薬と尿中バイオマーカーを開発する。ミトコンドリア傷害はCypDにより制御されるミトコンドリアの膜透過性遷移(MPT)が原因であると考え、そのメカニズムを明らかにすることを試みた。

(2)新規関連遺伝子の同定とリスク診断法の開発: あらたな関連遺伝子を同定し、発症リスクの診断法を確立する。シュウ酸カルシウム結石は、「一度形成されたら排出をしなければ体内から取り除くことができない」と考えられてきた。私たちは、結石に数%含有される有機物質(結石マトリックス)としてオステオポンチンを同定し、その機能解析のため、結石モデルマウスを確立した。その研究過程において、「結石が自然消失する」というこれまでの概念を覆す発見をした。この結石の消失現象の機序を解明するため、ゲノムワイド関連解析を行った。その結果、この結石の形成・消失には、腎尿細管細胞への結晶付着、結晶塊の間質移行、サイトカイン/

ケモカインなどMφ走化因子の発現、単球の走化・分化・血管内皮細胞との接着、Mφの成熟・貪食・細胞内消化・抗原提示・TGF- β 産生、というプロセスが存在することを見出した。さらに透過型電子顕微鏡で腎間質Mφの「結晶貪食像」を同定した。Mφには炎症型(M1)と抗炎症型(M2)の2種類が存在する。私たちはM2が結石消失の主体と仮定し、M2機能不全マウス(op/op)では結石形成が増加することを見出した。さらにM1・M2の誘導および骨髄由来M1・M2の投与によって、M1群では結石形成が増加し、M2群では減少することを同定した。このことから結石形成はM1・M2の表現型で決定すると考えられた。そこで、尿中の因子を網羅的に解析することで、新規関連遺伝子を同定し、リスク診断法に応用することを試みた。

3. 研究の方法

(1)ミトコンドリア傷害に着目した治療薬とバイオマーカーの開発:

8週齢の雄マウス(WT群)と雄CypD欠損マウス(KO群)に対してグリオキシル酸(80mg/kg)を6日間連続で腹腔内投与した。後に腎組織を摘出し以下の項目を比較検討した。結石形成の部位と形態をPizzolato染色と偏光顕微鏡を用いて評価し、画像解析ソフトを用いて結石形成量を定量化した。腎組織内の炎症を炎症性サイトカインであるMCP-1、IL-6、炎症性ケモカインであるTNF- α の免疫組織染色と定量PCRにて評価した。

(2)新規関連遺伝子の同定とリスク診断法の開発:

健常者(非結石患者)56名と、尿路結石患者の初発群24名、再発群24名にわけ、尿中の既知の尿路結石関連蛋白(IL-1、IL-1 β 、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-13、EGF、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、Growth-regulated oncogene (GRO)、Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)、Platelet-derived growth factor (PDGF-AA)、PDGF-AB/BB、Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES)、TGF- β)について網羅的に発現量を定量化した。

4. 研究成果

(1)ミトコンドリア傷害に着目した治療薬とバイオマーカーの開発:

WT群とCypD-KO群ではMCP-1、IL-6、TNF- α に有意な差は認めなかったが(それぞれ $p=0.604$, 0.356 , 0.549)、結石形成量はWT群がCypD-KO群に比べ有意に多かった($p < 0.05$)(図1)。酸化ストレスの発生もCypD-KO群で少なかった。電子顕微鏡による

観察では、CypD-KO 群でミトコンドリア傷害が微弱であり(図2)、CypD の存在により MPT が亢進し、ミトコンドリア傷害が惹起されることが示唆された。

図1: wild type と CypD-KO マウスに尿酸前駆物質を投与

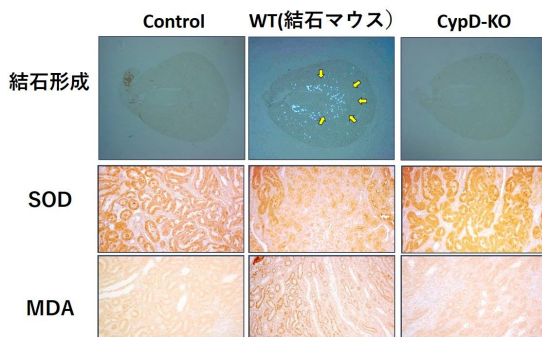
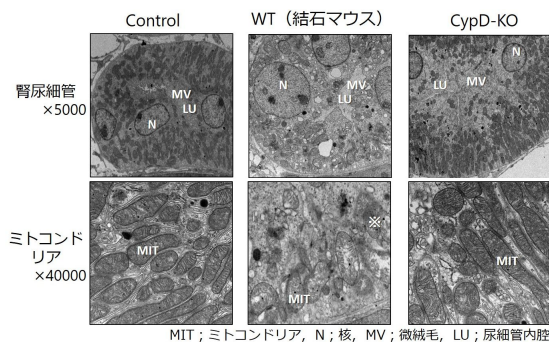
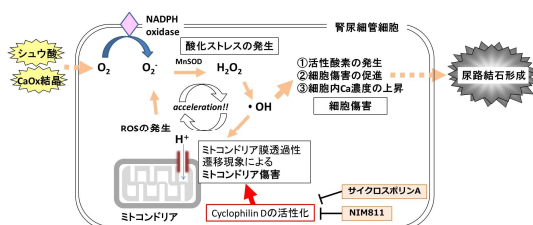


図2: 電子顕微鏡による観察: WT では、ミトコンドリア傷害がおこるが、cyclophilin D 欠損マウスではおこらない



これらのことから、腎組織内において、グリオキシル酸投与により生じた酸化ストレスならびに炎症性サイトカイン、ケモカインの産生亢進による炎症が発生し、その後にCypD 依存的な MPT が惹起されミトコンドリア傷害が発生し、尿路結石形成が促進されると考えられた。(図3)

図3: ミトコンドリア膜透過性遷移現象によるミトコンドリア傷害と結石形成への関連

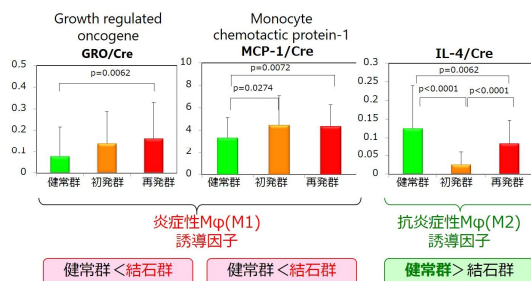


(2) 新規関連遺伝子の同定とリスク診断法の開発:

結石患者と健常者の尿をマルチプレックス解析で調べた結果、M2 誘導因子である IL-4 が結石群で有意に低値であることを見出した。また、M1 誘導因子である Growth

regulated oncogene (GRO) Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) が健常者で低値であった(図4)。健常者では、結石を処理する抗炎症性 M2-M が優性で、結石患者: 炎症性 M1-M が優性である可能性が見出された。

図4: 尿中物質のマルチプレックス解析結果



さらに腎乳頭生検組織を用い、結石患者では M1 関連遺伝子の発現が高値であり、M2 関連遺伝子の発現が低値であることを証明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 17 件)

Okada A, Hamamoto S, Taguchi K, Unno R, Sugino T, Ando R, Mizuno K, Tozawa K, Kohri K, Yasui T. Kidney stone formers have more renal parenchymal crystals than non-stone formers, particularly in the papilla region. BMC Urol. 18(1):19, 2018

Usami M, Okada A, Taguchi K, Hamamoto S, Kohri K, Yasui T. Genetic differences in C57BL/6 mouse substrains affect kidney crystal deposition. Urolithiasis. [Epub ahead of print]

Hamamoto S, Unno R, Taguchi K, Naiki T, Ando R, Okada A, Inoue T, Okada S, AbdelRazek M, Kohri K, Yasui T; SMART Study Group. Determinants of health-related quality of life for patients after urinary lithotripsy: ureteroscopy vs. shock wave lithotripsy. Urolithiasis. 46(2):203-210, 2018

Hamamoto S, Unno R, Taguchi K, Ando R, Hamakawa T, Naiki T, Okada S, Inoue T, Okada A, Kohri K, Yasui T; SMART Study Group. A new navigation system of renal puncture for endoscopic combined intrarenal surgery:

real-time virtual sonography-guided renal access. *Urology*. 109:44-50, 2017

安井孝周: 尿路結石の形成機序と治療への展望. *臨床泌尿器科* 71(13): 1039-1046, 2017

Taguchi K, Usawachintachit M, Hamamoto S, Unno R, Tzou DT, Sherer BA, Wang Y, Okada A, Stoller ML, Yasui T, Chi T. Optimizing RNA extraction of renal papilla biopsy tissue in kidney stone formers: a new methodology for genomic study. *J Endourol*. 31(9):922-929, 2017

Unno R, Taguchi K, Okada A, Ando R, Hamamoto S, Kubota Y, Zuo L, Tozawa K, Kohri K, Yasui T. Potassium-sodium citrate prevents the development of renal microcalculi into symptomatic stones in calcium stone-forming patients. *Int J Urol*. 24(1):75-81, 2017.

安井孝周, 岡田淳志, 瀧本周造, 田口和己, 海野怜, 杉野輝明: 特集 メタボリック症候群と腎泌尿器疾患 疾患予防への挑戦 分子生物学的機序からみたメタボリックシンドロームと尿路結石予防. *腎臓内科・泌尿器科*, 5(2):156-163, 2017

Taguchi K, Okada A, Hamamoto S, Unno R, Moritoki Y, Ando R, Mizuno K, Tozawa K, Kohri K, Yasui T. M1/M2-macrophage phenotypes regulate renal calcium oxalate crystal development. *Sci Rep*. 6:35167, 2016

Yasui T, Okada A, Hamamoto S, Ando R, Taguchi K, Tozawa K, Kohri K. Pathophysiology-based treatment of urolithiasis. *Int J Urol*. 24(1):32-38, 2017.

Taguchi K, Hamamoto S, Okada A, Unno R, Kamisawa H, Naiki T, Ando R, Mizuno K, Kawai N, Tozawa K, Kohri K, Yasui T. Genome-wide gene expression profiling of Randall's plaques in calcium oxalate stone formers. *J Am Soc Nephrol*. 28(1):333-347, 2017

Taguchi K, Okada A, Hamamoto S, Unno R, Kobayashi T, Ando R, Tozawa K, Gao B,

Kohri K, Yasui T. Differential roles

of peroxisome proliferator-activated receptor- and receptor- on renal crystal formation in hyperoxaluric rodents. *PPAR Res*. 2016:9605890, 2016

Rodgers A, Mokoena M, Durbach I, Lazarus J, de Jager S, Ackermann H, Breytenbach I, Okada A, Usami M, Hirose Y, Ando R, Yasui T, Kohri K. Do teas rich in antioxidants reduce the physicochemical and peroxidative risk factors for calcium oxalate nephrolithiasis in humans? Pilot studies with Rooibos herbal tea and Japanese green tea. *Urolithiasis*. 44(4):299-310, 2016

安井孝周: 尿路結石の分子機構の解明と新規予防法の開発に向けた展望. *Nagoya Medical Journal* 55(2) 61-67, 2016

安井孝周, 安藤亮介, 海野怜, 杉野輝明, 瀧本周造: 尿路結石と慢性炎症・生活習慣病. 別冊 *Bio Clinica* 慢性炎症と疾患 - 泌尿器の慢性炎症. 5(4): 32- 37, 2016

Taguchi K, Okada A, Hamamoto S, Iwatsuki S, Naiki T, Ando R, Mizuno K, Tozawa K, Kohri K, Yasui T. Proinflammatory and metabolic changes facilitate renal crystal deposition in an obese mouse model of metabolic syndrome. *J Urol*. 194(6):1787-96, 2015

[学会発表](計 11 件)

(Special Lecture) Yasui Takahiro: Renal stone Management for renal stone disease: epidemiology, endoscopic surgery and prevention. (SIU Around the World-Renal update)16th Urological Association of Asia (UAA) Congress 2018 年

(Symposium)(JUA/UAA Joint Symposium) Yasui Takahito: Japanese topics for stone management -epidemiology, endoscopic surgery, and prevention. 16th Urological Association of Asia (UAA) Congress 2018 年

(Symposium) Takahiro Yasui: Guidelines for stone management: what we have and what we need? UAA2017-15th Urological Association of Asia Congress. 2017 年

(Symposium) Yasui Takahiro, Unno Rei,

Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Okada Atsushi, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: The role of osteopontin in stone formation. 13th International Symposium on Urolithiasis, 2016年

(講演)安井孝周、井口正典、郡健二郎: 過去の疫学調査の総括. 日本尿路結石症学会第26回学術集会. 2016年

(Symposium) Takahiro Yasui: Japanese guidelines of urinary stone. Korean Endourology Society Annual Meeting 2016 (Deagu, Korea) 2016年

(特別講演)安井孝周: 尿路結石の分子機構の解明と新規予防法の開発に向けた展望(特別講演)第66回名古屋市立大学医学会総会. 2015年

(特別講演)安井孝周: 尿路結石の最前線. 第60回愛知県泌尿器科医会例会. 2015年

Takahiro Yasui, Atsushi Okada, Kazumi Taguchi, Masayuki Usami, Yasuhiro Fujii, Kazuhiro Niimi, Shuzo Hamamoto, Masahito Hirose, Ryosuke Ando, Yasunori Itoh, Keiichi Tozawa, Yutaro Hayashi, Kenjiro Kohri: Alendronate has a preventive effect for urolithiasis recurrence in men and postmenopausal women with osteoporosis. 2015 (110th) Annual Meeting of American Urological Association. 2015年

Takahiro Yasui, Kazuhiro Niimi, Atsushi Okada, Kazumi Taguchi, Yasuhiro Fujii, Yasuhiko Hirose, Yasuhiko Ito, Shuzo Hamamoto, Masahito Hirose, Keiichi Tozawa, Shoichi Sasaki, Yutaro Hayashi, Kenjiro Kohri: N-methyl-4-isoleucine cyclosporine, an inhibitor of mitochondrial cyclophilin D activation, prevents kidney stone formation by alleviating oxidative stress in renal tubular cells. 2015 (110th) Annual Meeting of American Urological Association. 2015年

Takahiro Yasui, Atsushi Okada, Masayuki Usami, Shuzo Hamamoto, Ryosuke Ando, Yasunori Itoh, Keiichi Tozawa, Shoichi Sasaki, Yutaro Hayashi, Nagoya, Japan, Yoshikazu Sato, Yoshihito Higashi, Kenjiro Kohri: Genetic diagnosis trial by

single nucleotide polymorphism analysis from a case-control study, using three novel loci associated with susceptibility to urolithiasis from a genome-wide association study (GWAS). 2015 (110th) Annual Meeting of American Urological Association (New Orleans, Louisiana, USA) 2015年

(図書)(計7件)

安井孝周: 泌尿器疾患 尿路結石症. 今日の診療のために ガイドライン外来診療 2018, 320-327, 第18版、編集主幹: 泉孝英、発行者: 鯨岡 修、発行: 日経メディカル開発、2018年

田口和己, 安井孝周: 尿路結石(泌尿器・生殖器の病気とくすり) 病気とくすり 2018 基礎と実践 Expert's Guide, pp622-626、南山堂、2018年

伊藤恭典, 安井孝周: 泌尿器疾患 尿路結石症. 今日の診療のために ガイドライン外来診療 2017, 315-322, 2017 発行: 2017年2月17日 第17版、発行: 日経メディカル開発

田口和己, 安井孝周: 尿路結石. 泌尿器系・生殖器系疾患. 薬局増刊号「病気とくすり」2017. pp615-619、2017年

安井孝周: 再発予防 薬物療法、尿路結石ハンドブック 2016年4月25日、中外医薬社 pp147-153

伊藤恭典, 安井孝周: 尿路結石症. ガイドライン外来診療 2016 pp 307-314 第16版発行、日経メディカル開発、2016年

田口和己, 安井孝周: 尿路結石(泌尿器系・生殖器系疾患) 病気とくすり 2016, pp601-605、2016年

ホームページ等:

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/uro.dir/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安井孝周 (Yasui Takahiro)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 40326153

(2) 研究分担者

岡田淳志 (Okada Atsushi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 70444956

濱本周造 (Hamamoto Shuzo)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：80551267

田口和己 (Taguchi Kazumi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：00595184

安藤亮介 (Ando Ryosuke)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：30381867

戸澤啓一 (Tozawa Keiichi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：40264733

郡健二郎 (Kohri Kenjiro)
名古屋市立大学・その他・学長
研究者番号：30122047