

令和元年5月20日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11055

研究課題名(和文)酸素ナノバブル水による尿路結石形成の抑制機序の解明と予防法への応用

研究課題名(英文) Elucidation of suppression mechanism for kidney stone formation by oxygen nano bubble water and application to the prevention method

研究代表者

廣瀬 泰彦 (HIROSE, YASUHIKO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：60381894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：尿路結石は、疫学、形成機序、結石と石灰化の構成成分など、動脈硬化と類似点が多い。近年、酸素を直径100nm以下のガス核として、Salting-out現象により安定化させた機能水、酸素ナノバブル(Oxygen nano-bubbles: ONB)水の抗炎症効果が報告された。炎症や組織変化をともなう動脈硬化などの疾病の治療薬となる可能性をもつ。そこで、私たちは、結石形成モデル動物を用いて、酸素ナノバブル水の、尿路結石形成抑制効果を調べた。酸素ナノバブル水は、尿細管細胞障害を低下させ、シュウ酸カルシウム結晶の接着因子であるオステオポンチンとヒアルロン酸の腎での発現を抑制し、腎結石形成を抑制する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎結石の初期形成には、腎尿細管細胞の傷害に伴う炎症が関わることを、私たちは発見した。近年、酸素を直径200nm以下のガス核として安定化させた酸素ナノバブル水は抗炎症作用をもつ機能水として、注目されている。また、酸素ナノバブルは非常に微細であることから、組織へ効率よく浸透し、低酸素状態を改善する。私たちはその点に着目し、結石モデルラットに酸素ナノバブル水を投与し、腎結石形成を抑制することに成功した。腎結石は慢性疾患の一つであるため、容易に継続可能な予防法が必要である。そこで、酸素と水から作られた酸素ナノバブル水の組織への浸透性、抗炎症効果に基づいて、安全で継続が可能な新規の結石予防法になりえる。

研究成果の概要(英文)：Kidney stone resembles arteriosclerosis in the mechanism, calcification composition and epidemiology. Water including oxygen nano-bubbles (nanometer-sized bubbles generated from oxygen microbubbles; ONB water) has anti-inflammatory effects. Based on these anti-inflammatory effects, ONB water has been reported as a useful therapy for atherosclerosis. Therefore, we investigated the inhibitory effects of ONB water on kidney stone formation using a hyperoxaluric rat model. Our results suggest that ONB water reduces crystal retention in hyperoxaluric rats due to decreased renal tubular cell injury and resulting expression of crystal binding molecules (osteopontin: OPN and hyaluronic acid: HA).

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎結石 酸素ナノバブル 抗炎症作用

1. 研究開始当初の背景

【尿路結石と動脈硬化の類似性】

尿路結石の発生頻度は急増し、日本での生涯罹患率は約 15%にもなり、5年再発率が 40~50%と高率であることから、社会問題であり、予防法の開発が必要である。私達は尿路結石の成因に、食生活、とくに脂質代謝異常が強く関連することを以下の成果より示唆してきた。(1)尿路結石の発生は日本では戦後欧米型食生活になると共に急増し、欧米先進国でも高頻度であること、(2)尿路結石のマトリックス成分として、はじめて私達が同定したオステオポンチン(OPN)とカルプロテクチン(CPT)が、動脈石灰化にも関与していること、(3)コレステロール食負荷ラット腎でオステオポンチンの発現が増加し結石が形成されること、(4)結石形成前に動脈石灰化と同様にマクロファージとそれに係わるサイトカイン(IL-2、TNF α 、ICAM-1、VCAM-1等)が腎臓で発現すること、などが挙げられる。特に動脈硬化の血管壁石灰化機序と結石形成機序が類似していることを動物実験、分子生物学的手法により証明し、臨床上、尿路結石症患者で脂質代謝異常、動脈硬化の合併が多くみられることも上記の裏付けとなる。

私達はこれまでの研究成果より、尿路結石の形成初期には、シュウ酸等による

細胞障害がオステオポンチンの発現や酸化ストレスの増強を起し、腎間質にマクロファージが誘導され、炎症性サイトカインの発現を介して、結石原基となる結晶を貪食、泡沫化し、結石の核となる形成機序を推測している。

【ナノバブルの開発と特徴】

近年、微細気泡技術の一つである酸素ナノバブルが、炎症性サイトカイン(TNF α)刺激による血管内皮細胞からの接着分子(ICAM-1、VCAM-1)発現と、活性化マクロファージの血管内皮細胞への接着を抑制することにより、動脈硬化を抑制することが報告された。微細気泡は、直径が 50 μm 以下になると、マイクロバブルと呼ばれ、生物化学的に特別な作用をもつ。しかし、マイクロバブルは、液体の中で上昇とともに消滅するため、不安定で、利用することができなかった。2004年、電解質イオンを含む水の中でマイクロバブルを瞬時に圧壊させることで、ナノバブルの製造と安定化が実現した(独立行政法人産業技術総合研究所,特願 2004-062044号)。気泡界面に濃縮した電荷の静電的反発力と濃縮したイオン類が気泡を包み込む殻として作用していることが、ナノバブルの安定化メカニズムである。ナノバブルは直径が 1 μm 以下の超微細な気泡であり、ナノバブル化された気体の種類により、オゾンナノバブル(特願 2004-062156号)と酸素ナノバブル(特願 2004-026160号)が、実用化されている。オゾンナノバブルは、微生物殺菌作用により、歯周病を改善させる効果、酸素ナノバブルは、魚介類の環境変化に対する適応性の向上、植物の成長促進など、生物に対しての活性効果が報告されている。マウスのマイクロバブル入浴ではインスリン様成長因子(IGF-1)の産生亢進がみられ、抗酸化作用、抗ストレス作用を持つことが明らかになり、2008年には、「組織の修復又は再生用製剤」として国際特許(WO 2008/072370 A1)が取得された。酸素ナノバブルは、酸素や水を用いた技術のため、安全性が高く、医療への応用が可能と考えられ、培養細胞実験では、動脈硬化の抑制作用が報告されていることから、発生機序が類似している尿路結石の予防効果が期待できる。本研究は、酸素ナノバブルによる尿路結石の形成抑制作用とその機序を明らかにし、臨床応用を目的とする。

2. 研究の目的

酸素ナノバブルは、その生物学的作用機序は未解明な点が多いものの、ナノテクノロジーとして、医療分野での応用が期待されている。本研究では、酸素ナノバブルは尿路結石でも形成抑制効果が期待できると考えて、尿路結石予防効果とその機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

酸素ナノバブル水(アクアナノ™)を100%ONB水と定義し、100%ONB水と、蒸留水を半々に混合し、50%ONB水とした。4週齢Sprague Dawley(SD)ラット60匹を、蒸留水を自由飲水するcontrol群、100%ONB水を自由飲水する100%ONB群、それぞれ蒸留水、50%ONB水、100%ONB水を自由飲水したのち、結石形成するために、7週齢から、胃管を用いて10%Ethylene glycol(EG)1.2mlを1日1回、Vitamin D₃0.5 μg を隔日、投与するEG群、EG+50%ONB群、EG+100%ONB群にわけた。EG投与7日間後、14日間後に

各群 6 匹ずつ、24 時間蓄尿、採血をおこない、腎を摘出した。偏光顕微鏡を用いて、腎断面の結石形成を観察し、Image-pro plus software を用いて定量した。
 尿細管細胞障害マーカーとして尿中 *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) 排泄を測定した。結石接着因子としてオステオポンチン、ヒアルロン酸の腎断面での発現を免疫染色し、発現面積を Image-pro plus software を用いて定量した。

4. 研究成果

【結果①】酸素ナノバブル水による結石形成量の減少効果

Control 群、100% ONB 群では、腎断面に結石形成を認めなかった。(data not shown)
 EG 群、EG+50%ONB 群、EG+100%ONB 群では、腎全体にび慢性に結石形成がみられた。(図 1)
 EG 群に比べて、酸素ナノバブル水を自由飲水した EG+50%ONB 群、EG+100%ONB 群は、結石形成量の有意な減少を認めた。(図 2)

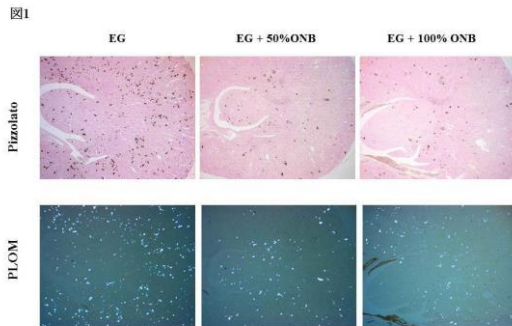
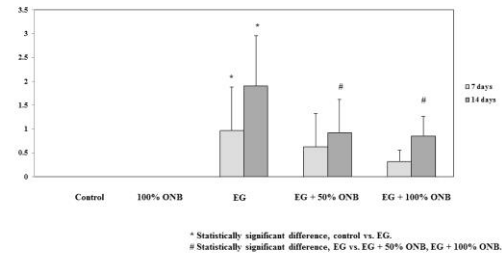


図2



【結果②】酸素ナノバブル水による尿細管細胞障害の抑制効果

EG 群に比べて、EG+100%ONB 群は、近位尿細管細胞障害のマーカーである尿中 NAG 排泄は、有意な減少を認めた。(図 3)

【結果③】酸素ナノバブル水による結石接着因子の発現抑制効果

[OPN]

Control 群に比べて、EG 群では腎全体に OPN の発現がみられた。EG+50%ONB 群、EG+100%ONB 群では、OPN の発現は局限し減弱している。

(図 4) 腎皮髄境界では、OPN の発現面積は、EG 群に比べ、EG+100%ONB 群では有意に減少した。(図 5)

[HA]

Control 群では、HA は、皮質には発現せず、皮髄境界ではわずかに発現していた。

Control 群に比べて、EG 群では、腎皮質、腎皮髄境界に HA の発現が強くみられた。EG+50%ONB 群、EG+100%ONB 群では、HA の発現は減弱していた。(図 6) 腎皮質における HA の発現面積は、EG 群に比べ、EG+100%ONB 群では有意に減少した。(図 7)

図3

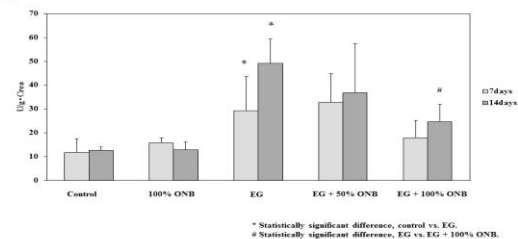


図5 腎皮髄境界におけるOPN発現面積

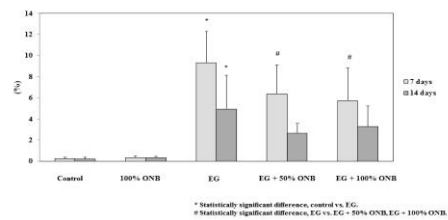


図6 HA

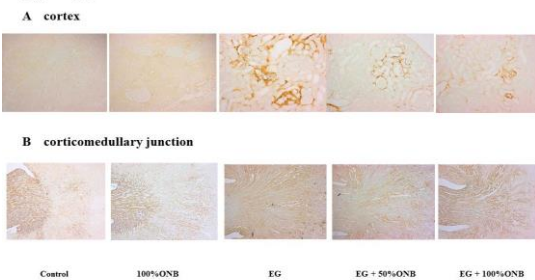
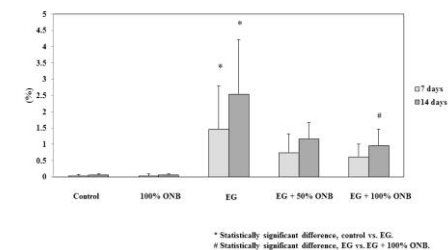


図7 腎皮質におけるHA発現面積



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 1 件)

1. Usami Masayuki, Okada Atsushi, Hamamoto Shuzo, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Genetic differences in C57BL/6 mouse substrains affect kidney crystal deposition. Urolithiasis, 46(6):515-522, 2018 (doi: 10.1007/s00240-018-1040-3.)

[学会発表] (計 2 件)

1. Sugino Teruaki, Taguchi Kazumi, Tanaka Yutaro, Unno Rei, , Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Okada Atsushi, Mogami Tohru, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: β 3-adrenergic receptor agonist prevents kidney stone formation by suppressing inflammatory adipocytokine expression and improving antioxidant action. The 33rd Annual EAU Congress, 2018.3.16-20, Copenhagen, Denmark
2. Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Tanaka Yutaro, Sugino Teruaki, Unno Rei, Ando Ryosuke, Okada Atsushi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Discovery of a novel gene expression profile of renal papilla including Randall's plaque from calcium phosphate over calcium oxalate stone formers. The 33rd Annual EAU Congress, 2018.3.16-20, Copenhagen, Denmark

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：郡 健二郎

ローマ字氏名：(KOHRI kenjiro)

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：その他部局等

職名：学長

研究者番号：30122047
研究分担者氏名：安井 孝周
ローマ字氏名：(YASUI takahiro)
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：教授
研究者番号：40326153
研究分担者氏名：戸澤 啓一
ローマ字氏名：(TOZAWA keiichi)
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：教授
研究者番号：40264733
研究分担者氏名：岡田 淳志
ローマ字氏名：(OKADA atsushi)
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：准教授
研究者番号：70444966
研究分担者氏名：濱本 周造
ローマ字氏名：(HAMAMOTO shuzo)
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：講師
研究者番号：80551267
研究分担者氏名：田口 和己
ローマ字氏名：(TAGUCHI kazumi)
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：助教
研究者番号：00595184

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。