

令和元年5月22日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20153

研究課題名(和文)重合OPNとオートファジーの働きに着目した尿路結石予防薬開発のための基礎研究

研究課題名(英文) Basic research for urolithiasis preventive drug development focused on the function of polymerized OPN and autophagy

研究代表者

海野 怜 (UNNO, rei)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：40755683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は、尿路結石形成過程における重合OPNの働きと、オートファジーについて調べた。結石形成過程においてOPNの重合体は検出できず、単量体で存在することがわかった。オートファジーは、尿路結石形成試みるため、オートファジーを上流で抑制するmTORに着目した。結石形成とともにmTOR活性が上昇したことから、mTORの上昇がオートファジーの原因と考えられた。そこで、mTOR阻害薬であるラパマイシンを用いて結石形成抑制効果を検討したところ、投与したマウスでは有意に結石形成が抑制された。以上からmTOR阻害薬は、オートファジーを介した新規結石予防薬になる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿路結石は、全世界で有病率10%に達し、形成機序の解明と再発予防法の確立は急務である。今回、傷害を受けた細胞が自己を防御するために誘導するオートファジーに着目したところ、尿路結石形成過程においてオートファジーが有意に低下することを見出した。さらに、オートファジー亢進による結石抑制効果を見出した。今回のオートファジーを介した新規尿路結石の治療は、無機物質の管理や、物理的な排石促進剤などの従来の結石治療とは全く違った着想である。生体内における恒常的な機能の活性化であり、自己修復能の亢進による結石治療という観点は世界初の試みであり、創造的である。

研究成果の概要(英文)：We found that autophagic activity was significantly decreased in mouse RTCs exposed to calcium oxalate (CaOx) monohydrate crystals and in the kidneys of GFPLC3B transgenic mice with CaOx nephrocalcinosis induced by glyoxylate. An impairment of autophagy was also observed in the mucosa with plaques of CaOx kidney stone formers. We determined that the decrease in autophagy was caused by an upregulation of MTOR, which consequently resulted in the suppression of the upstream autophagy regulator TFEB. Furthermore, we showed that an MTOR inhibitor could recover a decrease in autophagy and alleviate crystal-cell interactions and the formation of crystals associated with increased inflammatory responses. Taken together, we conclude that autophagy compromised by MTOR deregulation is a fundamental feature in the pathology of kidney stone formation, and propose that chemical inhibition of MTOR could be a prospective strategy for disease suppression.

研究分野：泌尿器科学分野

キーワード：尿路結石 オートファジー 炎症 酸化ストレス mTOR

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

尿路結石の生涯罹患率は食文化の欧米化に伴い上昇し、我が国では男性では100人中15人、欧米では20人にも達する国もみられる。またその5年再発率は40~50%と難治性であり、形成機序の解明と再発予防法の確立は急務といえる。これまでの尿路結石の予防法は飲水と食事療法を中心とした、尿中の無機物質の制御が中心であったが、尿路結石は依然として増加の一端を辿っている。尿路結石は90%の無機物質と数%の有機物質(マトリックス)から構成されている。私たちは、マトリックスに着目し、尿路結石の形成に強く関与することを明らかにしてきた。その中でも、マトリックスの主成分であるオステオポンチン(OPN)が結石形成機序において促進因子として機能することを世界に先駆けて証明した。さらに、OPNは重合することにより生物学的活性を高めると報告されている。また腎尿細管細胞傷害は、結石形成のトリガーとなることがわかっている。傷害を受けた細胞は自己を防御するためオートファジーを誘導するが、結石形成過程におけるオートファジーの働きについてはこれまで検討されていない。

### 2. 研究の目的

本研究ではOPNの重合と、オートファジーによる細胞傷害に着目し、以下の3つの観点から尿路結石の形成機序の解明と予防法への応用を試みる。

- [1] 尿細管培養細胞を用いた重合OPN発現とオートファジー誘導の機能解析
- [2] 結石形成モデルマウスにおける重合OPN発現、オートファジー誘導の機能分析
- [3] オートファジーに着目した尿路結石予防のための分子標的治療の開発

### 3. 研究の方法

[1] マウス尿細管上皮細胞(M-1細胞)に結晶に暴露させ、尿細管上皮細胞における重合OPN、オートファジーの発現を検討する。

#### 【対象と方法】

M-1培養系を準備する。シュウ酸カルシウム一水和物結晶(20ng/cm<sup>2</sup>)を添加し0, 6, 12, 24時間後に細胞と上清を回収する

#### 【評価項目】

OPNとオートファジー関連蛋白、その他結石関連遺伝子を定量、比較する。また結晶添加量・添加時間と、重合OPN・オートファジーの発現の関連を調べる。オートファジーを動的に評価するため、GFP-RFP-LC3(tfLC3)を細胞にトランスフェクションしLC3の動態を評価する。さらに、結晶によるオルガネラ傷害を蛍光免疫染色等で評価。

[2] 結石形成モデルマウスにおいて、重合OPN、オートファジーの発現を調べ、それらが尿路結石の形成に及ぼす影響を解析する。

#### 【対象と方法】

私たちは、マウス(C56BL6)に対してシュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸(GOX)を腹腔内投与することで、腎尿細管皮髄境界部を中心に結石形成が促進することを発見した。

今回、C56BL6/Jマウスに対して、GOX80mg/kg投与し、血清、24時間尿、腎組織を採取し、結石形成量と重合OPNの発現、オートファジーの発現を調べ、結石形成との関連を調べる。次に、オートファゴソーム可視化マウス(LC3 transgenic mice)を用いてLC3の発現、p62の発現を評価する。

#### 【評価項目】

腎組織中の結石形成量を偏光顕微鏡と、シュウ酸カルシウム(CaOx)染色であるPizzolato染色にて評価し、画像解析ソフトにて定量化を行う。OPNとオートファジー関連蛋白を定量、比較する。血清、24時間尿で結石関連因子を評価する。オートファジーは透過型電子顕微鏡を用い形態の観察を行う。オートファジー活性の漸減の原因を調べるため、オートファジーを上流で制御するmTOR活性と転写因子であるTFEBの発現で検討した

[3] オートファジーの誘導において、活性化されたmTORは、オートファジーを抑制すると考えられる。

#### 【対象・方法】

上記In vitro, In vivo実験の実験系で、mTOR阻害薬を投与した群を追加し、細胞への結晶の付着、結石形成の差を評価する。

#### 【評価項目】

結晶の細胞への付着、腎組織中の結石形成量を評価し、画像解析ソフトにて定量化を行う。血清、24時間尿に対し、結石関連因子を比較する。オートファジーを関連タンパクの定量、透過型電子顕微鏡を用い形態の観察を行う。

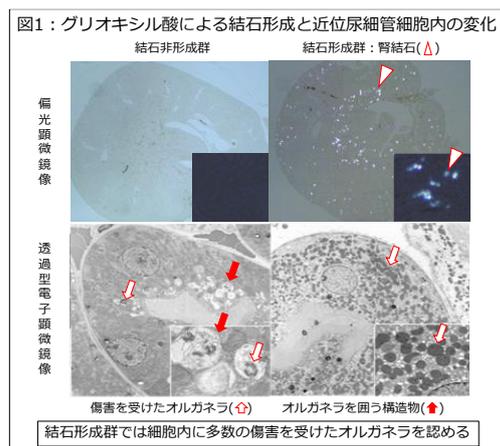
### 4. 研究成果

[1] まずシュウ酸Ca結晶を尿細管細胞に添加して重合OPNと、オートファジーの発現を検討した。重合OPNを調べるため細胞を回収しWestern blotを行ったが期待された80kD以上のバンドは出ず、モノマーOPNのみバンドのみしか確認できなかった。次にオートファジーを調べるためLC3-B、p62のWestern blot、蛍光免疫染色の行ったところ、シュウ酸Caの添加でオー

トファジーは早期で亢進するが、6時間以上暴露させると低下した。tfLC3を細胞にトランスフェクションさせたところ、上記の結果と同様にシュウ酸Caの添加でオートファジーは早期で一時的に亢進するが、6時間以上暴露させると有意にオートファジーが低下した。ミトコンドリア傷害をTOMM20の免疫染色、さらにMitotrackerで検討したところ、結晶暴露によりミトコンドリア傷害が強くなり、ミトコンドリア由来のROSが上昇した。さらに、細胞内のリソソームの傷害を、酸性化傷害はLysotrackerを用いて、膜傷害はGalectine-3の免疫染色で検討した。結晶添加により、リソソームの酸性化傷害、膜傷害を認めた。これら傷害ミトコンドリア・リソソームは、ユビキチン化されており、上記オートファジーにより選択的に処理されている可能性が示唆された。炎症因子(IL6, TNF- $\alpha$ )と酸化ストレス(SOD-1)のPCRでは、オートファジーが低下し始めると炎症因子、酸化ストレスが有意に上昇した。

[2]結石モデルマウスの腎におけるOPNのWestern blotを行ったが、培養細胞の実験同様に予想された重合OPNのバンドは認められなかった。さらなる検討として、エチレングリコールの自由引水により結石を形成させたラットで、重合OPNの存在を調べた。しかしながらWestern blotでは80kD以上のバンドは出ず、結石形成過程において結石中のOPNはモノマーで存在している可能性が示唆された。

次に結石形成量とオートファジーの発現を調べたところ、透過型電子顕微鏡では結石形成前において、腎近位尿細管細胞内に多数の傷害を受けたリソソームやミトコンドリアを囲い込むオートファゴソームを認め(図1)、Western blotでp62の発現は低下していた。一方で結石形成後では、傷害を受けたミトコンドリアやリソソームが目立ち、オートファゴソームなどは認めず、Western blotでp62の発現が有意に上昇しており、オートファジーが低下していることが分かった。次に、LC3 transgenic miceを用いた実験では、結石形成を認めるマウスではLC3のdotsが有意に低下した。p62の免疫染色を行ったところ、LC3とは相反する発現パターンを示したことから、結石形成によりオートファジーが低下することが示唆された。



次にオートファジー低下の原因精査のため、In vitro, In vivoともmTOR活性の評価をp-p70S6Kとnuclear-TFEBのWestern blotで評価したところ、CaOx結晶の添加や結石形成に伴ってmTOR活性が上昇すること、核内TFEBは低下していた。以上からこれら上流因子の影響でオートファジーが低下していることがわかった。

[3]In vitro, In vivo実験とも、結石形成過程において、重合OPNの発現が見られず、OPNはモノマーで存在している可能性が示唆された。そのため、OPN重合阻害薬を用いた結石予防は、困難であると判断した。オートファジーに関しては、培養細胞・動物モデルとも、mTOR亢進とTFEBの核内移行の阻害によりオートファジーが低下することがわかった。以上から、mTOR阻害薬投与によるmTOR活性の抑制により、結石形成が抑制されるか検討を行った。

まずIn vitroでは、mTOR阻害薬であるTorin 1を1 $\mu$ M結晶と同時に投与したところ、オートファジーは有意に亢進しミトコンドリア・リソソームの傷害が有意に抑制された。さらに、細胞内の炎症や酸化ストレスが抑制され、結果として結晶の細胞への付着が有意に抑制された。次にIn vivoではmTOR阻害薬であるRapamycin1mg/kgをGOXと同時に投与したところ、オートファジー低下が投与2日目まで有意に抑制された。結石形成も同様に2日目まで有意に抑制された。しかしながら投与4日目では有意差を認めなかった。

以上の結果からオートファジーは、傷害オルガネラを選択的に処理することで腎結石形成を抑制した。結晶による上流シグナルを介したオートファジー機構の破綻が結石形成を促進することから、これらシグナルをターゲットとした、新規治療薬開発の可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1件)

1. Rei Unno, Tsuyoshi Kawabata, Kazumi Taguchi, Teruaki Sugino, Shuzo Hamamoto, Ryosuke Ando, Atsushi Okada, Kenjiro Kohri, Tamotsu Yoshimori, Takahiro Yasui. Deregulated MTOR (mechanistic target of rapamycin kinase) is responsible for autophagy defects exacerbating kidney stone development. Autophagy. 2019. Accepted.

[学会発表] (計 8件)

1. Unno R, Unno N, Taguchi K, Okada A, Ando R, Hamamoto S, Tozawa K, Kohri K, Yasui

T: Selective autophagy via mTORC1 and TFEB signals in the suppression of kidney stone formation. American Urological Association Annual Meeting 2018.

2. Unno R, Kawabata T, Takase H, Sugino T, Tanaka Y, Taguchi K, Hamamoto S, Ando R, Okada A, Kohri K, Yoshimori T, Yasui T. Selective autophagy via mTORC1 and TFEB signals suppresses kidney stone formation. 第106回日本泌尿器科学会総会 (2018).
3. 海野 怜、杉野輝明、田口和己、藤井泰普、浜本周造、岡田淳志、坂倉毅、安井考周. オートファジー制御により人結石形成は抑制される. 第28回日本尿路結石症学会学術集会 (2017).
4. 海野 怜、杉野輝明、田口和己、浜本周造、安藤亮介、岡田淳志、戸澤啓一、安井考周. オートファジー制御により腎結石形成は抑制される. 第60回日本腎臓学会学術総会 (2017).
5. Unno R, Unno N, Sugino T, Taguchi K, Okada A, Ando R, Hamamoto S, Tozawa K, Kohri K, Yasui T: Autophagy maintains cellular homeostasis and inhibits renal crystal formation. American Urological Association Annual Meeting 2017.
6. 海野 怜、杉野輝明、田口和己、浜本周造、安藤亮介、岡田淳志、安井考周. Autophagy's protective roles for kidney stone formation. 第105回日本泌尿器科学会総会 (2017).
7. 海野 怜、田口和己、杉野輝明、浜本周造、岡田淳志、伊藤恭典、戸澤啓一、安井考周. 腎結石形成におけるオートファジーの関与と機能解析. 第27回日本尿路結石症学会学術集会 (2016).
8. 海野 怜、田口和己、藤井泰普、浜本周造、安藤亮介、岡田淳志、戸澤啓一、安井考周. 腎結石形成におけるオートファジーの関与と機能解析. 第50回日本腎臓学会学術総会 (2016).

〔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：  
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：  
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

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：安井孝周  
ローマ字氏名：(YASUI takahiro)  
研究協力者氏名：戸澤啓一  
ローマ字氏名：(TOZAWA keiichi)  
研究協力者氏名：岡田淳志  
ローマ字氏名：(OKADA atsushi)  
研究協力者氏名：安藤亮介  
ローマ字氏名：(ANDO ryosuke)

研究協力者氏名：濱本周造  
ローマ字氏名：(HAMAMOTO shuzo)  
研究協力者氏名：田口和己  
ローマ字氏名：(TAGUCHI kazumi)

※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。