

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16718

研究課題名(和文) オステオポンチン糖鎖に着目した尿路結石診断・予防薬開発に関する基礎研究

研究課題名(英文) Study on focusing glycosylation of osteopontin for urinary stone diagnosis and development of preventive medicine.

研究代表者

野呂 大輔 (Noro, Daisuke)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：60793635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、結石形成に伴うOPN糖鎖構造変化を詳細に解析し、糖鎖性バイオマーカーによる結石診断法や治療応用のための基礎的解析を目的とした。尿路結石患者では健常者と比較して、尿中OPN濃度は有意に減少したにも関わらず糖鎖変異OPN(Gal3C-S-OPN)が有意に増加していた。尿路結石の有無とGal3C-S-OPN量が関連していることから、OPN糖鎖変異が尿路結石診断、再発予測に関する糖鎖性バイオマーカーに成り得る可能性が示唆された。これらの成果をIJMSに発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では100人中6人、欧米では20人にも達する国もみられ、生産年齢の男性に多く、その成因の究明と再発予防法の確立は急務である。本研究で得られた成果として、尿路結石患者では健常者と比較して、尿中OPN濃度は有意に減少したにも関わらず糖鎖変異OPN(Gal3C-S-OPN)が有意に増加していた。尿路結石の有無とGal3C-S-OPN量が関連していることから、OPN糖鎖変異が尿路結石診断、再発予測に関する糖鎖性バイオマーカーに成り得る可能性が示唆された。尿路結石は、再発が多く結石形成の再発予測ができれば、患者のQOLを改善するバイオマーカーとなり、社会的意義は、非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：Osteopontin (OPN) is a matrix glycoprotein of urinary calculi. This study aims to identify the role of aberrant glycosylation of OPN in urolithiasis. We retrospectively measured urinary glycosylated OPN normalized by urinary full-length-OPN levels in 157 urolithiasis patients and 110 healthy volunteers and 21 patients were prospectively longitudinal follow-up during stone treatment. This study showed that OPN concentration in urine was significantly lower in stone forming patients than in HVs. However, Gal3C-S-OPN was significantly increased in stone forming patients, which suggested its potential as a biomarker of urolithiasis formation. Therefore, Gal3C-S-OPN/uFL-OPN levels might be a biomarker of stone formation. Urolithiasis is a disease with a high rate of recurrence. Gal3C-S-OPN might be useful as a predictor of recurrence, and elucidation of the mechanism of urinary stone recurrence may lead to prevention.

研究分野：泌尿器科学

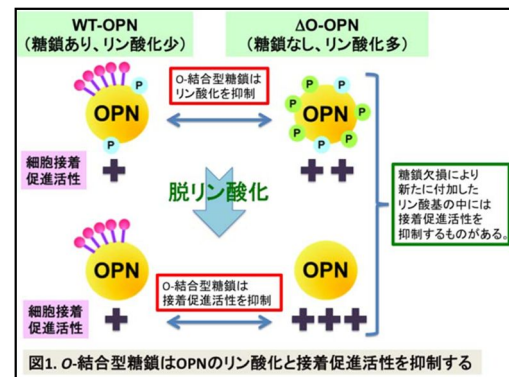
キーワード：オステオポンチン 糖鎖 レクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

尿路結石の形成過程には、マトリックス糖タンパク質であるオステオポンチン(OPN)の発現が重要であることは良く知られているが、そのほとんどは、OPN 遺伝子、ゲノム解析あるいは、タンパク質の機能解析に焦点をあてた研究であり、OPN の糖鎖部分の機能に着目し、結石形成との関連について調査した研究は皆無である。本研究では、OPN 糖鎖が尿路結石の形成過程に果たす役割について調査し、結石形成における糖鎖性バイオマーカーや治療応用のための基礎的データを得ることを目的とする。尿路結石は 90%の無機物質と数%の有機物質から構成されている。尿路結石内に数%含まれるマトリックス成分としてオステオポンチン(OPN)がクローニングされ、その後、ノックアウトマウスなどを用いた研究でシュウ酸 Ca を含む尿路結石の形成過程に OPN の発現が必須であることが明らかとなった。さらに近年、尿路結石症は、コレステロール過剰摂取などによる生活習慣病(メタボリックシンドローム)の一疾患と捉えられている。尿路結石症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 100 人中 6 人、欧米では 20 人にも達する国もみられ、生産年齢の男性に多く、その成因の究明と再発予防法の確立は急務である。分子生物学、ゲノム解析を中心に研究が進められているが画期的な診断法、再発予防法、治療薬などは開発されていない。

OPN は、その分子中に 1ヶ所の N 結合型糖鎖修飾部位と 5箇所の O 結合型糖鎖修飾部位を有する糖タンパク質(糖鎖付加により 32kDa~66 kDa)であり、2014年に Kariya らは、腫瘍細胞において OPN 上の O 結合型糖鎖修飾が OPN の細胞接着促進活性およびリン酸化を抑制することを明らかにし、オステオポンチンに修飾されている糖鎖の構造変化が細胞機能に影響することを明らかにした (Kariya et al., *Biochem. J.* 2014) (図 1)。



しかしながら、尿路結石研究分野における OPN に関する研究は、遺伝子、ゲノム、タンパク質の機能解析に焦点をあてた研究に限られている。OPN の糖鎖部分の機能に着目し、結石形成との関連を調べている研究は皆無である。糖鎖修飾は、生体分子の機能調節に非常に重要な役割を果たしている翻訳修飾の 1つであり、上記、腫瘍細胞における OPN 糖鎖変異の知見と同様に結石形成過程における OPN 糖鎖の機能を明らかにすることは、学術的に興味深い課題と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、予備実験で得られた結石形成に伴う OPN 糖鎖構造変化をさらに詳細に解析し、糖鎖性バイオマーカーによる結石診断法や治療応用のための基礎的解析を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、臨床検体を用いて健常人と結石形成患者の尿中 OPN 糖鎖構造を詳細に解析する。さらに結石形成モデルマウスの OPN の糖鎖を解析し、結石形成によって変化する OPN 糖鎖構造を同定する。同定した糖鎖構造の合成に参与する糖転移酵素の阻害剤投与あるいは、*in vivo* ノックダウンモデルにより、結石形成マウスにおける OPN 糖鎖の構造変化と結石形成への影響を明らかにするために以下の計画で検討を進めた。

平成 30 年度

- 1) レクチンアレイにより健常人と結石形成患者の尿中 OPN の糖鎖プロファイルを比較する。

健常人および結石形成患者より供与された尿を組換えレクチン固定化アレイチップ(Rexam 社) と反応させる。組換えレクチンアレイに結合した OPN を抗 OPN 抗体で検出することにより、結石形成に関わる OPN 糖鎖構造変異を検出する。測定系の性能評価には、組み換え OPN 溶液あるいは、既知濃度の OPN を含む健常あるいは、結石患者由来の尿を用いる。

- 2) 質量解析により健常人と結石形成患者の尿中 OPN の糖鎖構造を詳細に解析する。

健常人および結石形成患者より供与された尿から抗 OPN 抗体カラムにより尿中 OPN を精製する。精製 OPN 溶液を糖鎖自動前処理装置(Sweetblot)で処理し、OPN 由来 N 結合型糖鎖を分離する。あるいは、精製 OPN 溶液から O 結合型糖鎖分離キット(住友ベークライト)により OPN 由来 N 結合型糖鎖を分離する。分離した各糖鎖の構造を質量分析装置にて解析する。

1 および 2 のどちらかがうまく解析できない場合には、一方のみを利用して、研究を進める。

平成 31 年度以降

- 3) 結石形成モデルマウスの OPN の糖鎖をレクチンアレイおよび質量解析で解析する。

前年度臨床検体で得られた結果を検証するため、結石形成マウスモデルにおける尿中 OPN 糖鎖の解析を前年度同様レクチンアレイおよび質量解析を用いて行う。前年度の結果と合わせ結石形成によって変化する OPN 糖鎖構造を同定する。

- 4) 結石形成モデルマウスを用いた結石形成関連 OPN 糖鎖の合成に関する糖転移酵素の阻害剤投与あるいは、*in vivo* ノックダウンによる結石形成への影響の調査

結石形成に関する糖鎖構造の合成に関する糖転移酵素の阻害剤投与あるいは、*in vivo* ノックダウンモデルにより、結石形成マウスにおける OPN 糖鎖の構造変化と結石形成への影響を免疫組織化学的および分子生物学的手法を用いて調査する。

- 5) 同定された結石形成に関連する糖鎖を有する OPN のレクチンアレイによる検出系の開発。

3,4) で得られたデータから同定された結石形成に関連する糖鎖を有する OPN を特異的に検出する組み換えレクチンを固定化したアレイチップを用いて、結石形成を反映する診断アレイを開発する。

4 . 研究成果

平成 30 年度の計画であった以下の 1) 2) 項目の実験から、1) のレクチンアレイにより健常人と結石形成患者の尿中 OPN の糖鎖プロファイルを比較が実施可能であった。2) の質量解析による患者由来 OPN 糖鎖構造については、各患者から、精製した OPN を用いて、N 型および O 型糖鎖構造解析を実施したが、精製 OPN の量が少なく糖鎖構造に関するデータを得ることができなかった。そのため、以後の実験では、レクチンアレイやおよびレクチンプロットングの手法で糖鎖構造を実施した。当初、計画 3), 4) の結石モデルマウスでの糖鎖構造検討予定であったが、有望な糖鎖構造が同定されたため、5) のレクチンアレイによる OPN 糖鎖変異検出系の開発と臨床検体を用いた診断アレイの有用性について以下のように検討した。

後ろ向き横断研究として、尿路結石患者 110 名と健常者 157 名の尿中 OPN 濃度を ELASA 法

で測定し、尿中 OPN 糖鎖をレクチンアレイおよびレクチンプロットングにて検索した(図 2)。患者背景を表 1 に示す。

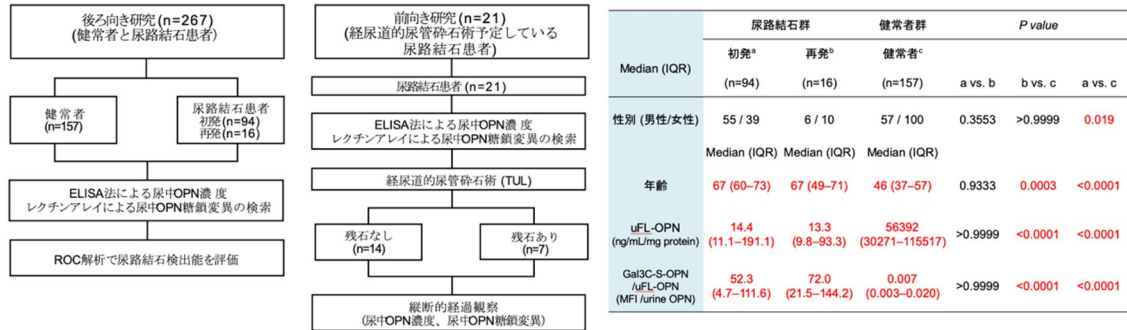


図 2 レクチンアレイによる OPN 糖鎖変異検出法 表 1 尿路結石患者と健常者の OPN 濃度と
の有用性検討で実施した後ろ向き研究と前向き研究 Gal3C-S-OPN (後ろ向き研究)

267 名の尿検体 15mL を VIVASPIN TURBO 15 (分画分子量 3000) にて濃縮し、凍結乾燥、BCA 法でタンパク質濃度を測定した。尿中タンパク質濃度として、2 mg/mL に調製した。尿中タンパク質濃度を調整した尿中 OPN 濃度を ELISA 法で測定し、尿中 OPN 糖鎖プロファイルをレクチンアレイ、ウエスタンプロットング、レクチンプロットングで解析した。後ろ向き研究から、尿路結石患者は健常者と比べ尿中 OPN 濃度は有意に減少した(p<0.001) (図 3)。

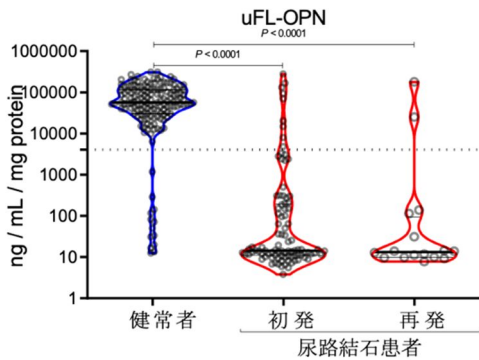
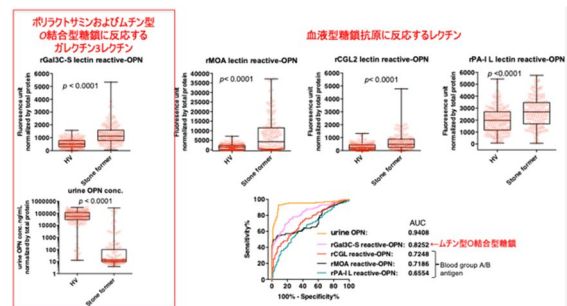


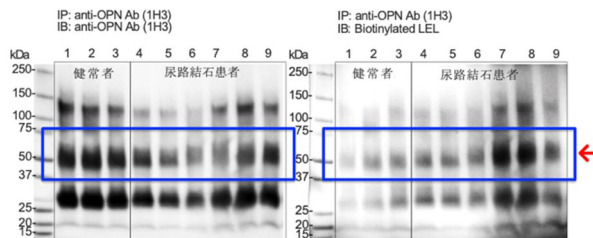
図 3 各集団における尿中 OPN 濃度



尿中 OPN が減少するにも関わらず、尿路結石群で増加したのは 4 種類のレクチン反応性 OPN
Gal3C-S-レクチン反応性 OPN で尿路結石予測における AUC が最も高かった

図 4 レクチンアレイによる尿中糖鎖変異 OPN の検出

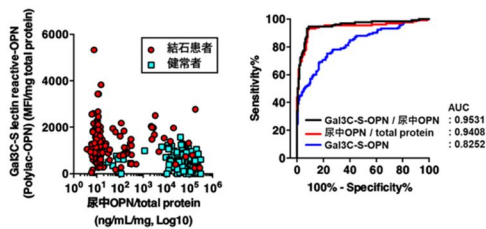
さらにレクチンアレイにて 21 種類の糖鎖変異 OPN 量を測定した結果、4 種類のレクチン反応性 OPN が尿路結石群で増加を認めた。ROC 解析の結果から、尿路結石予測における AUC が最も高い、Gal3C-S レクチン反応性 OPN (Gal3C-S-OPN) に注目した(図 4)。図 4 の結果から、Gal3C-S レクチンの反応性から、ムチン型結合型糖鎖が修饰された OPN が結石患者で増加することが示唆された。さらにポリラクトサミン糖鎖を認識するトマトレクチン (LEL レクチン) によるレクチンプロットングにて、尿路結石患者では健常者と比較して、LEL レクチン反応性 OPN のバンド強度が出て増加していることを確認した(図 5)。



健常者で uFL-OPN が高い 尿路結石患者でポリラクトサミン糖鎖構造を有する OPN が増加

図 5 濃縮尿中 OPN の免疫沈降およびイムノプロットングおよびトマトレクチンプロットングによる検出

図 5 の結果から、ポリラクトサミン構造は、ムチン型 O 結合型糖鎖に修飾される事がよく知られており、結石患者では、ポリラクトサミン構造を有するムチン型 O 結合型糖鎖に修飾された OPN が増加することが示唆された。



尿中 OPN 濃度と Gal3C-S-OPN から尿路結石患者を感度 90%、特異度 92% (AUC 0.9531) で検出可能

図 7 尿中 OPN 濃度と Gal3C-S-OPN による尿路結石患者の診断精度 (後ろ向き解析)

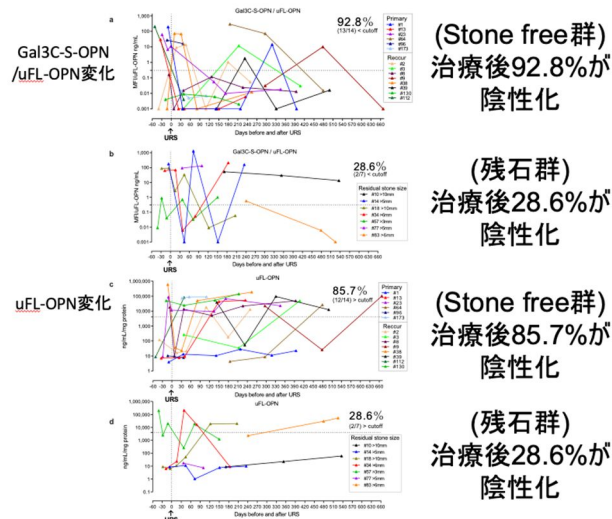
以上より、Gal3C-S-OPN は尿路結石患者で有意に増加し、尿路結石患者の尿中 OPN の糖鎖構造変化が明らかとなった ($p < 0.001$)。Gal3C-S-OPN と OPN 濃度から尿路結石患者を感度 90%、特異度 92% (AUC 0.953) で予測可能であった (図 7)。

後ろ向き解析で決定された感度 90% におけるカットオフ値を用いて前向き縦断研究を実施した。尿路結石患者 21 名の経尿道的尿管碎石術 (TUL) 前後の尿を採取し、尿中 OPN 濃度および尿中 OPN の糖鎖変異を検索した。患者背景を表 2 に示す。

	TUL 後		P value
	Stone free 群 (n=14)	残石群 (n=7)	
性別 (男性/女性)	5 / 9	6 / 1	0.0635
年齢	Median (IQR) 61 (54-70)	Median (IQR) 74 (57-77)	0.3690
Gal3C-S-OPN (MFI)	0.03 (0.001-12)	30 (0.001-176)	0.08
uFL-OPN (ng/mL/mg protein)	12003 (15.5-49527)	35.6 (8.8-18322)	0.0385
Gal3C-S-OPN/uFL-OPN (MFI /urine OPN)	0.02 (0.001-10.2)	1.87 (0.026-88.6)	0.0030
観察期間 (日)	345 (213-407)	206 (150-525)	0.5815

後ろ向き研究から得られた Gal3C-S レクチン反応性 OPN 測定値より尿路結石を感度 90% で予測できる値を cut off 値とし、TUL 後残石なし群 (14 例) と TUL 後残石あり群 (7 例) に分けて経時的に比較検討した (図 8)。

表 2 尿路結石治療前後の OPN 濃度と Gal3C-S-OPN (前向き研究)



前向き縦断研究から、TUL 後残石なし群 (14 例) では 92.8% で結石治療後 Gal3C-S-OPN が cut off 値を下回り、TUL 後残石あり群 (7 例) では 71.4% で結石治療後 Gal3C-S-OPN が cut off 値を上回った。このことから尿路結石消失とともに Gal3C-S-OPN は減少し、尿路結石残存症例では Gal3C-S-OPN が高値であることが明らかとなった。

図 8 感度 90% における Cutoff 値を基準とした Gal3C-S-OPN/uFL-OPN の前向き縦断解析結果

以上の結果から、尿路結石患者では健常者と比較して、尿中 OPN 濃度は有意に減少したにも関わらず糖鎖変異 OPN (Gal3C-S-OPN) が有意に増加していた。尿路結石の有無と Gal3C-S-OPN 量に関連していることから、OPN 糖鎖変異が尿路結石診断、再発予測に関する糖鎖性バイオマーカーに成り得る可能性が示唆された。今後さらに検討を重ね、尿中 OPN の糖鎖構造解析、Gal3C-S-OPN に関わる糖転移酵素の解析を行い、Gal3C-S-OPN が結石形成過程においてどのような意義を持つのか詳細に検討する必要がある。これらの成果を IJMS に発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Anan Go, Yoneyama Tohru, Noro Daisuke, Tobisawa Yuki, Hatakeyama Shingo, Sutoh Yoneyama Mihoko, Yamamoto Hayato, Imai Atsushi, Iwamura Hiromichi, Kohada Yuki, Mikami Jotaro, Ito Jun, Kaiho Yasuhiro, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Yasuhiro, Sato Makoto, Ohyama Chikara	4. 巻 21
2. 論文標題 The Impact of Glycosylation of Osteopontin on Urinary Stone Formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 93 ~ 93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21010093	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------