

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591887

研究課題名（和文） 尿路結石形成時の酸化ストレス発生機序の解明と遺伝子組み換えマウスを用いた機能解析

研究課題名（英文） Evaluation of urinary stone formation with respect to oxidative stress and analysis of osteopontin function using transgenic mice.

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・講師

研究者番号：40326153

研究成果の概要（和文）：尿路結石の形成初期には酸化ストレスによる腎尿細管細胞傷害が重要であることを明らかにした。酸化ストレス発生の機序としてミトコンドリア傷害が示唆され、ミトコンドリア傷害の抑制剤により結石形成を抑制することができた。また、結石マトリクスであるオステオポンチンの機能部位の変異マウスを用い、そのRGD部位が結石形成開始時に、カルシウム結合領域が結石の成長に、関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Renal tubular cell injury, especially mitochondrial damage, and oxidative stress induce the early stage of calcium oxalate crystal formation in mice. We investigated the effects of impaired domains of OPN, the RGD sequence and two calcium-binding sites on crystal formation. Each domain contributes to the mechanism by which OPN stimulates crystal formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：尿路結石、ミトコンドリア、オステオポンチン、酸化ストレス、透過型電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

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。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。近年、有機物質が同定され、結石形成の場である腎臓において各種遺伝子が結石形成に伴って発現することが

示されていた。しかし、遺伝子レベルに研究が進んでからも画期的な再発予防法は開発されていない。尿路結石患者は常に結石が形成されているのではなく、個人の形成されやすさ（遺伝要因）に形成されやすい環境（食事、飲水量、肥満、アシドーシス等）（環境要因）が重なり発症すると考えられる。

細胞内のミトコンドリアの損傷によって活性酸素が発生することが知られてお

り、結石形成時にはシュウ酸による細胞障害→ミトコンドリアの損傷→活性酸素の発生→細胞傷害のサイクルが発生していると推察した。結石形成時の細胞障害、ミトコンドリアの機能、活性酸素の発生について詳細に検討することで、この経路を明らかにし、結石形成機序を解明し予防法を開発しようという着想に至った。

また、私達は尿路結石のマトリクスとしてオステオポンチン (OPN) を同定し、その作用を結石形成の各段階で検討し、必須な物質であることを示してきた。尿細管細胞への蔭酸暴露などに対して OPN は組織の保護作用を示すものの、ある一定以上の発現があると蔭酸カルシウム結晶から結石への成長を促すと推察された。OPN はアミノ酸配列から、情報伝達のリガンドとして作用する RGD 部位、カルシウム結合部位などの機能部位が知られ、それぞれが蛋白の機能に重要な役割を担っていると考えられていた。

そこで、本研究では尿路結石形成時の尿細管細胞の状態を形態学的 (免疫染色を併用した電子顕微鏡による観察) および遺伝子レベルで詳細に検討し、尿路結石形成の主要遺伝子である OPN の機能解析をノックアウトマウスと RGD 配列、カルシウム結合部位など各機能部位を欠失させた、dominant negative トランスジェニックマウスを用いて行うことを着想した。

2. 研究の目的

本研究は形成時の腎尿細管での病態を詳細に検討し、発生の予防法を確立することを目的とした。具体的には以下の項目を明らかにすることを目的とした。

尿路結石モデルマウスで尿細管細胞障害を電子顕微鏡で詳細に観察し、形態的に機序を明らかにする。

尿細管細胞のミトコンドリア活性、酸化ストレスマーカーを経時的に測定し、酸化ストレスとの関係を明らかにする。

抗酸化ストレス薬を投与し、結石形成予防の可能性を検討する。

RGD 配列を RGE に変換した OPN を発現するトランスジェニックマウス、カルシウム結合部位を欠損させた OPN を発現するトランスジェニックマウスを作成し、正常 OPN 発現マウス、OPN 欠損マウスと、glyoxylate

を腹腔内投与した際の尿路結石形成、結石の形態などについて検討する。

3. 研究の方法

【研究 1】結石形成時の尿細管細胞微細構造の観察

結石形成時の尿細管微細構造の観察と OPN 蛋白の局在の変化について検討する。尿路結石モデルマウスとしてグリオキシル酸 100mg/Kg を、結石モデルラットとしてグリオキシル酸 120mg/Kg を腹腔内投与し、1, 3, 6, 9, 12, 24, 48 時間後に sacrifice し、腎臓を摘出した。摘出した腎臓を 2.5% glutaraldehyde で固定し、脱水し、epoxy resin に包埋し、透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察し、尿細管微細構造、とくにミトコンドリアと細胞膜について経時の変化を観察した。

【研究 2】ミトコンドリア傷害抑制物質を用いた結石形成抑制の試み

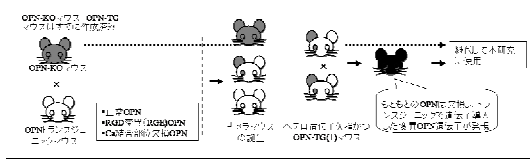
1% Etyleneglycol を 14 日間自由飲水して作成する結石モデルラットに、ミトコンドリア傷害のきっかけとなる mitochondrial permeability transitional pore の開口抑制剤である cyclosporine A を 2.5, 5.0, 10.0 mg/Kg/day で腹腔内投与した。投与開始 14 日後に腎を摘出し、結石形成を偏光顕微鏡と Pizzolato 染色で検討した。

【研究 3】OPN ノックアウトマウスと変異 OPN 発現トランスジェニックマウスを用いた OPN 機能部位の解析

OPN-KO マウスと正常 OPN、RGD 配列を RGE に変換した OPN、カルシウム結合部位を欠損した OPN を発現するトランスジェニックマウスを作成した。

OPN-KO マウスでは蔭酸前駆物質の投与により、結石が形成されるものの、wild type と比較し、結石形成数が少なく、偏光顕微鏡の観察で結石が小さく成長せず、形成された結石が消失する機能も緩除であり、OPN は結石の成長、消失に機能していることを本研究開始前に確認している。OPN-KO マウスと変異 OPN トランスジェニックマウスを交配し、wild type 由来の OPN の発現はノックアウトされているものの、トランスジェニックマウス由来のそれぞれの OPN を発現する遺伝子組み換えマウスを作成し、繁殖を行った。結石モデルマウスと同様に蔭酸前駆物質であるグリオキシル酸 100mg を腹

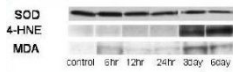
腔内投与して結石形成を行い、それぞれの変異オステオポンチンによる結石形成量と形態について検討した。(図 1)



4. 研究成果

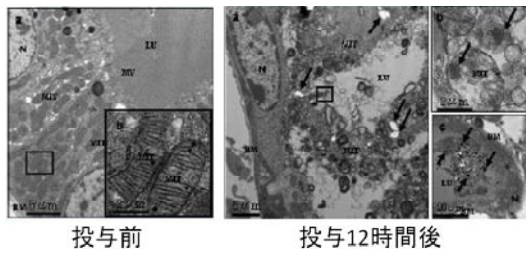
【研究 1】結石形成時の尿細管細胞微細構造の観察

結石形成の初期過程について、摘出腎から蛋白を抽出し、western blot にて酸化ストレスマーカーである SOD の低下と MDA、4HNE の上昇を確認し、結石形成過程に酸化ストレスが関与することを明らかにした。(図 2)



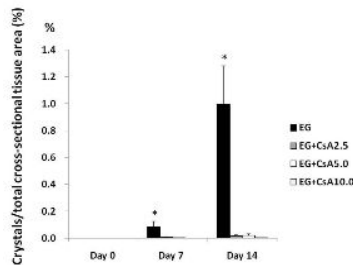
2)

電子顕微鏡で、結石形成初期の腎尿細管細胞を詳細に観察し、ミトコンドリアの膨化、崩壊がおこり、微絨毛の脱落がみられ、結石が形成されていくという過程をとらえ、結石形成機序を明らかにした(図 3)。



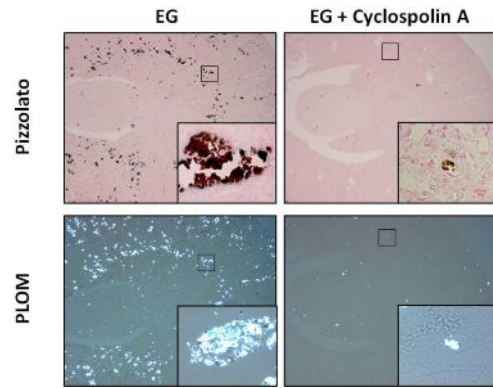
【研究 2】ミトコンドリア傷害抑制物質を用いた結石形成抑制の試み

Cyclosporine A の投与で結石モデルラットの結石形成量が減少し(図 4)、結石の成長を認めなかった(図 5)。



(図 4) 結石形成量は cyclosporine A (CsA) の投与で低下した。

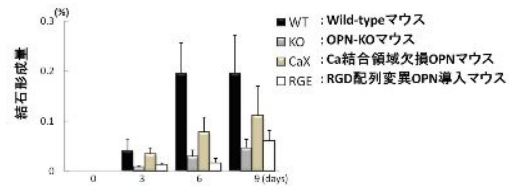
ミトコンドリア傷害が結石形成に関与し、cyclosporine A が抑制作用をもつことが示唆された。



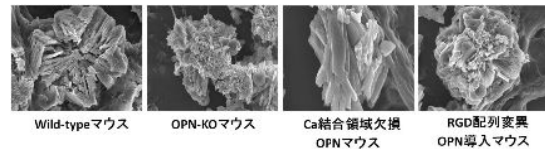
(図 5) Cyclosporine の投与で結石形成量が減少し、結石の成長を認めなかった。

【研究 3】OPN ノックアウトマウスと変異 OPN 発現トランスジェニックマウスを用いた OPN 機能部位の解析

Wild-type と比較し、OPN ノックアウトマウスでは結石が形成されないが、Ca 結合領域欠損 OPN マウスでは結石形成量の全体はやや多く、RGD 配列変異 OPN マウスでは結石形成量が少なかった。(図 6)



形成された結石の形態を走査型電子顕微鏡で観察すると、wild-type では花弁状に結石が成長していくのに対して、OPN-KO マウスでは結石が砂状で成長が見られなかった。RGD 配列変異 OPN マウスでは wild-type に対して比較的結石の形態が保たれているが、Ca 結合領域欠損マウスでは結石が周囲に成長していく形態が見られなかった。(図 7)



これらの結果から、OPN の RGD 配列は結石形成量に、カルシウム結合領域は結石の形態に影響を及ぼすことが明らかになった。結石マトリクスである OPN についてそれぞれの機能部位での結石形成における機能を明らかにすることができた。

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 8 件)

- ① Masahito Hirose, Takahiro Yasui, Atsushi Okada, Shuzo Hamamoto, Hideo Shimizu H, Yasunori Itoh, Keiichi Tozawa, Kenjiro Kohri. Renal tubular epithelial cell injury and oxidative stress induce calcium oxalate crystal formation in mouse kidney. *Int J Urol.*, 査読有, 17(1): 83-93, 2010
- ② Shuzo Hamamoto, Shintaro Nomura, Takahiro Yasui, Atsushi Okada, Masahito Hirose, Hideo Shimizu, Yasunori Itoh, Keiichi Tozawa, Kenjiro Kohri. Effects of impaired functional domains of osteopontin on renal crystal formation: analyses of OPN-transgenic and OPN-knockout mice. *J Bone Miner Res.*, 査読有, 25(12): 2712-2723, 2010
- ③ Atsushi Okada, Takahiro Yasui, Yasuhiro Fujii, Kazuhiro Niimi, Shuzo Hamamoto, Masahito Hirose, Yoshiyuki Kojima, Yasunori Itoh, Keiichi Tozawa, Yutaro Hayashi, Kenjiro Kohri. Renal macrophage migration and crystal phagocytosis via inflammatory-related gene expression during kidney stone formation and elimination in mice; detection by association analysis of stone-related gene expression and microstructural observation. *J Bone Miner Res.*, 査読有, 25(12):2425-35, 2010.
- ④ Bing Gao, Takahiro Yasui, Xiuli Lu, Hongge Zhou, Jian Liu, Ping Liu, Atsushi Okada, Chunling Xiao, Kenjiro Kohri. Matrix Gla Protein Expression in NRK-52E Cells Exposed to Oxalate and Calcium Oxalate Monohydrate Crystals. *Urol Int.*, 査読有, 85(2): 237-41, 2010.
- ⑤ Takahiro Yasui, Yasunori Itoh, Atsushi Okada, Shuzo Hamamoto, Masahito Hirose, Takahiro Kobayashi, Keiichi Tozawa, Kenjiro Kohri. Alendronate reduces the excretion of risk factors for calcium phosphate stone formation in

postmenopausal woman with osteoporosis. *Urologia Int.*, 査読有, 83(2): 226-229, 2009

- ⑥ Atsushi Okada, Shintaro Nomura, Yuji Higashibata, Shuzo Hamamoto, Masahito Hirose, Yasunori Itoh, Takahiro Yasui, Keiichi Tozawa, Kenjiro Kohri. Morphological conversion of calcium oxalate crystals into stones is regulated by osteopontin in mouse kidney. *J Bone Miner Res.*, 査読有, 23(10):1629-37, 2008.
- ⑦ Masahito Hirose, Keiichi Tozawa, Atsushi Okada, Shuzo Hamamoto, Hideo Shimizu, Yasue Kubota, Yasunori Itoh, Takahiro Yasui, Kenjiro Kohri. Glyoxylate induces renal tubular cell injury and microstructural changes in experimental mouse. *Urol Res.*, 査読有, 36(3-4):139-47, 2008.
- ⑧ Keiichi Tozawa, Takahiro Yasui, Atsushi Okada, Masahito Hirose, Shuzo Hamamoto, Yasunori Itoh, Kenjiro Kohri. NF- κ B activation in renal tubular epithelial cells by oxalate stimulation. *Int J Urol.*, 査読有, 15(10):924-8, 2008.

[学会発表] (計 24 件)

- ① 安井孝周、小林隆宏、広瀬真仁、濱本周造、岡田淳志、伊藤恭典、戸澤啓一、郡健二郎。尿路結石の遺伝子診断法と病態別にみた予防薬(シンポジウム)。第60回日本泌尿器科学会中部総会(名古屋市) 2010. 11. 30-12. 1 (12. 1 発表)
- ② 安井孝周、濱本周造、広瀬真仁、岡田淳志、伊藤恭典、戸澤啓一、郡健二郎。オステオポンチン機能とゲノム遺伝子解析からの発症機序解明と臨床応用(シンポジウム: 尿路結石発症の謎にせまる)。第98回日本泌尿器科学会総会(盛岡市) 2010. 4. 27-30 (4. 27 発表)
- ③ 岡田淳志、中岡和徳、廣瀬泰彦、新美和徳、藤井泰普、小林隆宏、宇佐美雅之、濱本周造、広瀬真仁、伊藤恭典、安井孝周、戸澤啓一、郡健二郎。腎結石の形成と消失において結石関連遺伝子の発現変化と腎マクロファージ動態は相関する。第98回日本泌尿器科学会総会(盛岡市)

2010. 4. 27-30 (発表 : 4. 29 発表)
- ④ Yasunori Itoh, Mugi Yoshimura, Kazuhiro Niimi, Masayuki, Usami, Shuzo Hamamoto, Takahiro Kobayashi, Masahito Hirose, Atsushi Okada, Takahiro Yasui, Keiichi Tozawa, Kenjiro Kohri. The role of long-term loading of cholesterol in renal crystal formation. 6th eULIS Symposium (13th European Symposium on Urolithiasis) (Lake of Como/Lecco, in Italy) Oct 15-17, 2009 (Oct 15)
- ⑤ Keiichi Tozawa, Takahiro Yasui, Masahito Hirose, Masayuki Usami, Shuzo Hamamoto, Yasuhiko Hirose, Atsushi Okada, Yasunori Itoh, Yutaro Hayashi, Kenjiro Kohri. The role of NF- κ B on renal stone formation. 2009 (104th) Annual Meeting of American Urological Association (Cicago, Irinoi, USA) April. 25-30. 2009 (4. 29)
- ⑥ Yasunori Itoh, Takahiro Yasui, Atsushi Okada, Masahito Hirose, Shuzo Hamamoto, Keiichi Tozawa, Yutaro Hayashi, Kenjiro Kohri. Effects of Microgravity Enhancement of Oxidative Stress in Human Renal Tubular Cells. 2009 (104th) Annual Meeting of American Urological Association (Cicago, Irinoi, USA) April. 25-30. 2009 (4. 29)
- ⑦ Atsushi Okada, Keiichi Tozawa, Kazuhiro Niimi, Yasuhiko Hirose, Takahiro Kobayashi, Masayuki Usami, Shuzo Hamamoto, Masahito Hirose, Yasunori Itoh, Takahiro Yasui, Yutaro Hayashi, Kenjiro Kohri. Osteopontin has an important role in kidney stone formation and elimination via renal macrophage recruitment and activation. 2009 (104th) Annual Meeting of American Urological Association (Cicago, Irinoi, USA) April. 25-30. 2009 (4. 29)
- ⑧ 安井孝周、戸澤啓一、郡健二郎. 再発予防なくして結石治療のゴールはない：尿路結石領域「尿路結石症アップデート」. 第 97 回日本泌尿器科学会総会 (岡山) 2009. 4. 16-19 (4. 17)
- ⑨ 広瀬真仁、廣瀬泰彦、小林隆宏、浜本周造、宇佐美雅之、岡田淳志、伊藤恭典、安井孝周、戸澤啓一、郡健二郎. 尿路結石発生起点におけるオステオポンチンの結晶凝集メカニズム～オステオポンチンノックアウトマウスを用いた超微細構造観察～. 第 97 回日本泌尿器科学会総会 (岡山) 2009. 4. 16-19 (4. 17)
- ⑩ 浜本周造、岡田淳志、広瀬真仁、小林隆宏、伊藤恭典、安井孝周、戸澤啓一、郡健二郎. オステオポンチンの尿路結石形成に関わる機能的アミノ酸配列の同定と機能解析. 第 97 回日本泌尿器科学会総会 (岡山) 2009. 4. 16-19 (4. 17)
- ⑪ 伊藤恭典、吉村麦、広瀬真仁、廣瀬泰彦、岡田淳志、新美和寛、小林隆宏、宇佐美雅之、浜本周造、安井孝周、戸澤啓一、郡健二郎. 高脂肪食負荷によりラット腎結石形成は促進される. 第 97 回日本泌尿器科学会総会 (岡山) 2009. 4. 16-19 (4. 18)
- ⑫ 浜本周造、安井孝周、岡田淳志、藤田啓治、戸澤啓一、郡健二郎. 尿路結石に関わるオステオポンチンの機能的アミノ酸配列の同定とその機能解析. 第 18 回泌尿器分子・細胞研究会 (鹿児島) 2009. 2. 13-14 (発表 2. 14)
- ⑬ 安井孝周、岡田淳志、高兵、広瀬真仁、伊藤恭典、戸澤啓一、郡健二郎. 骨基質蛋白 matrix gla protein のカルシウム尿路結石形成における発現の検討. 第 26 回日本骨代謝学会 (大阪市) 2008. 10. 29 ~31 (発表日 10. 29)
- ⑭ 安井孝周、岡田淳志、広瀬真仁、濱本周造、伊藤恭典、戸澤啓一、郡健二郎. シュウ酸前駆投与物質投与マウスから学ぶこと—尿細管細胞障害とマトリクスについて— (ワークショップ：過シュウ酸尿症から学ぶこと). 第 96 回日本泌尿器科学会総会 (横浜) 2008. 4. 25-27 (4. 26)

[その他]

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・講師

研究者番号 : 40326153

(2)研究分担者

戸澤 啓一 (TOZAWA KEIICHI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40264733

伊藤 恭典 (ITO H YASUNORI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：70295608

岡田 淳志 (OKADA ATSUSHI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：70444966

郡 健二郎 (KOHRI KENJIRO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30122047