

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09532

研究課題名(和文)尿酸代謝と生活習慣病としてのカルシウム結石の分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms between uric acid and calcium urinary stone as lifestyle disease

研究代表者

宮澤 克人(MIYAZAWA, Katsuhito)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：60219772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高尿酸血症のカルシウム結石形成における役割を解析した。マイクロアレイでは、シュウ酸カルシウム(COM)結晶刺激よりイヌ遠位尿細管上皮細胞(MDCK細胞)において時間・濃度依存的にMCP-1, IL-8, CXCL10などの炎症系遺伝子群がアップレギュレートされた。Xanthine oxidase阻害薬であるフェブキソスタットは時間・濃度依存的にCOM結晶刺激によるこれら遺伝子群をダウンレギュレーションした。MCP-1, IL-8, CXCL10のmRNA発現をリアルタイムRT-PCRにてバリデーションしてマイクロアレイでの結果を確実とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内外の疫学調査では高尿酸血症・痛風は尿路結石と最も密接な生活習慣病であり、尿酸結石については腎尿管でのインスリン抵抗性の低下による尿pH低下などが発生機序の一因と報告されている(Hess B. Arab J Urol. 10: 258-264 2012)が発生頻度が最も高いカルシウム結石に対する基礎的機序は解明されていなかった。本研究においてカルシウム結石と生活習慣病である抗尿酸血症の関連機序の一因を解明するとともに薬剤の作用機序に基づいた両疾患の効率的な治療効果を得た。今後は再発予防に対する医療経済への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of febuxostat on stone formation, especially on MCP-1 and the expression of other inflammation-related genes. Madin-Darby canine kidney cells were exposed to febuxostat, followed by calcium oxalate monohydrate crystals. MCP-1 mRNA expression levels were determined by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction analysis. DNA microarray analysis was utilized to evaluate gene expression. Calcium oxalate monohydrate crystals activated MCP-1 mRNA expression in a time- and concentration-dependent manner. Febuxostat suppressed monocyte chemoattractant protein-1 expression. The expression levels of a group of inflammatory genes, including IL-8 and CXCL10, which are downstream of reactive oxygen species, fluctuated similarly to the observed MCP-1 fluctuations and were reduced by febuxostat pretreatment.

研究分野：Urology

キーワード：urinary stone calcium oxalate uric acid xanthine oxidase hyperuricosuria

## 1. 研究開始当初の背景

わが国の尿路結石罹患率は、2005年全国疫学調査 (Yasui et al. *Urology* 71: 209. 2008) で急増が明らかとなった。2015年全国疫学調査でも罹患率は不変、かつ好発年齢が高齢化し、治療では尿路内視鏡手術が激増していた (Sakamoto, Miyazawa et al. *Int J Urol.* 25: 373. 2018)。同様に罹患率が増加している米国では尿路結石治療に年間 380 億ドル (4 兆円) を要している (Antonelli et al. *Eur Urol* 66: 724. 2014)。さらに、尿路結石による死亡率も増加傾向と報告されている (Kum et al. *BJU Int.* 118: 140. 2016)。従って、尿路結石の発生機序の解明と再発予防は、国民の健康と医療費抑制にとって重要な課題である。

また、国内外の疫学調査から尿路結石は高血圧、糖尿病、脂質異常症などの合併が高率で、生活習慣病の一つと認識され始めた。米国では高尿酸血症・痛風は尿路結石と最も密接な生活習慣病で結石罹患のオッズ比 1.92 (95% CI : 1.44-2.56) と報告されている (Scales Jr. CD. et al. *Eur Urol* 62: 160. 2012)。一方、わが国の成人男性の高尿酸血症の頻度は 30 歳以降で 30% に達している (高尿酸血症・痛風の治療ガイドライン第 2 版)。

尿酸は尿酸結石のみならずカルシウム結石形成を促進し (Coe FL et al. *J Clin Invest*, 115: 2598. 2005)、高尿酸血症を合併した尿路結石成分では尿酸カルシウムが多く、その機序は結晶学的知見から Heterogeneous nucleation、Epitaxial crystal growth などが提唱されているが未だ明らかではない。

一方、尿酸生成過程における Xanthine oxidase は図のとおり生活習慣病と密接な関係が知られている。そのシグナル過程で発生する活性酸素や MCP-1 などの炎症性ケモカインはカルシウム結石形成過程においても重要な働きを成すことが報告されている (Khan. *Urol Res* 33: 349. 2005)。

## 2. 研究の目的

高尿酸血症のカルシウム結石形成における役割を尿酸代謝の Xanthine oxidase に焦点を当て生物学的、特に腎尿細管細胞と腎間質の機能における視点から解析すること、ならびに Xanthine oxidase 阻害薬によるカルシウム尿路結石形成抑制を実証することとした。

## 3. 研究の方法

### (1) 腎尿細管培養細胞に対する尿酸と Xanthine oxidase 阻害薬の直接作用の解明

in vitro で尿酸のカルシウム結石形成促進作用の分子機構を解析するとともに Xanthine oxidase 阻害薬による高尿酸とカルシウム結石形成抑制を検証する。

尿酸添加による MDCK 細胞形態観察 (Pizzolato 染色、von Kossa 染色、免疫染色、TUNEL 染色を含む光学および電子顕微鏡)

MDCK 細胞の結石関連物質 (RPTF1, OPN, MCP-1, THP など) の蛋白および遺伝子発現の測定 (PCR と Western blot) とマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析  
酸化ストレスマーカー (SOD, 8-OHdG) の測定  
Xanthine oxidase 阻害薬添加による比較検証

(2) 動物モデルでの尿酸と Xanthine oxidase 阻害薬の結石形成抑制効果の検証

in vitro の結果を尿路結石形成ラットモデルに応用して in vivo で証明する。

過剰尿酸ラットの尿酸と Xanthine oxidase 阻害剤付加群を飼育

24 時間尿採取と結石関連尿中物質の測定と尿中過飽和度の算定

摘出腎組織の組織学的観察と原子吸光法での組織内 Ca 測定および結石関連物質 (RPTF1, OPN, MCP-1, THP など) の蛋白および遺伝子発現の測定 (PCR と Western blot)

#### 4. 研究成果

高尿酸血症のカルシウム結石形成における役割を解析した。

マイクロアレイでは、シュウ酸カルシウム (COM) 結晶刺激よりイヌ遠位尿管上皮細胞 (MDCK 細胞) において時間・濃度依存的に MCP-1, IL-8, CXCL10 などの炎症系遺伝子群がアップレギュレートされた。Xanthine oxidase 阻害薬であるフェブキソスタットは時間・濃度依存的に COM 結晶刺激によるこれら遺伝子群をダウンレギュレーションした。MCP-1, IL-8, CXCL10 の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR にてバリデーションしてマイクロアレイでの結果を確実とした。

We examined the effects of febuxostat on stone formation, especially on *MCP-1* and the expression of other inflammation-related genes.

Madin-Darby canine kidney cells were exposed to febuxostat, followed by calcium oxalate monohydrate crystals. *MCP-1* mRNA expression levels were determined by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction analysis. DNA microarray analysis was utilized to evaluate gene expression.

Calcium oxalate monohydrate crystals activated *MCP-1* mRNA expression in a time- and concentration-dependent manner. Febuxostat suppressed monocyte chemoattractant protein-1 expression. The expression levels of a group of inflammatory genes, including *IL-8* and *CXCL10*, which are downstream of reactive oxygen species, fluctuated similarly to the observed *MCP-1* fluctuations and were reduced by febuxostat pretreatment.

これらの結果を論文報告 (Int J Urol (2021) 28: 339-345) した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Katsuhito Miyazawa, Dan Nakai, Yuka Nakamura, Takanori Tatsuno, Shinya Inoue, Yusuke Nakazawa, Yasuhito Ishigaki	4. 巻 28
2. 論文標題 Effects of the xanthine oxidase inhibitor, febuxostat, on the expression of monocyte chemoattractant protein-1 and synchronous genes in MDCK cells treated with calcium oxalate monohydrate crystals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Urol	6. 最初と最後の頁 339-345
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iju.14450. Epub 2021 Jan 3.	査読の有無 有
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
研究分担者	井上 慎也  (INOUE Shinya)  (20740997)	金沢医科大学・医学部・助教   (33303)	
研究分担者	中澤 佑介  (NAKAZAWA Yusuke)  (50743689)	金沢医科大学・医学部・助教   (33303)	

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
---------	---------