

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21658

研究課題名（和文）分子生物学・鉱物学・隕石学の融合による尿路結石の形成機序解明と新規予防法の創設

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of urinary stone formation and the establishment of novel preventive methods through the integration of molecular biology, mineralogy, and meteoritics.

研究代表者

田口 和己（Taguchi, Kazumi）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・講師

研究者番号：00595184

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、医工連携プロジェクトとして尿路結石の形成過程を解明するため、鉱物学・隕石学の技術を活用した。尿路結石の結晶構造の解析、蛍光免疫染色を用いた有機成分の分布構造の解析から、尿路結石には無機成分のCOMやCOD結晶の構造が存在し、有機成分のOPNやRPTF-1が結晶内に分布していることが明らかになった。

またオステオポンチン（OPN）の役割を調べるための結石モデルマウス実験から、OPNが結晶形成に關与する重要な蛋白質であり、免疫細胞のシグナル伝達や貪食機能を制御することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果から、結石が無機分子・有機分子からいくつかの代表的なタイプに分かれることが明らかになった。これらのCOM・CODまたOPNなどの機能特性は、結石の形成メカニズムにも重要な役割を担っており、今後、バイオマーカーの探索や、これらをターゲットとした新規治療の開発にも繋がる。本研究のような新たな視点から病態解明を行うことで、これまでとは違った視点での治療を確立することができ、増大する尿路結石患者の減少にも貢献できると思われる。

研究成果の概要（英文）：In their research, we examined the structure and composition of urinary tract stones. We used polarizing microscopy to observe crystal structures and conducted spectroscopic analysis to study the distribution of inorganic components (COM and COD) and organic components (OPN, RPTF-1, and Cal-A). We also investigated the role of OPN in crystal adhesion and explored its interaction with macrophages. The results revealed the presence of COM, COD, and a heterogeneous COM structure in the stones. OPN was found to play a crucial role in crystal formation and also regulate immune cell functions. These findings contribute to a better understanding of urinary tract stone formation and may aid in the development of prevention strategies.

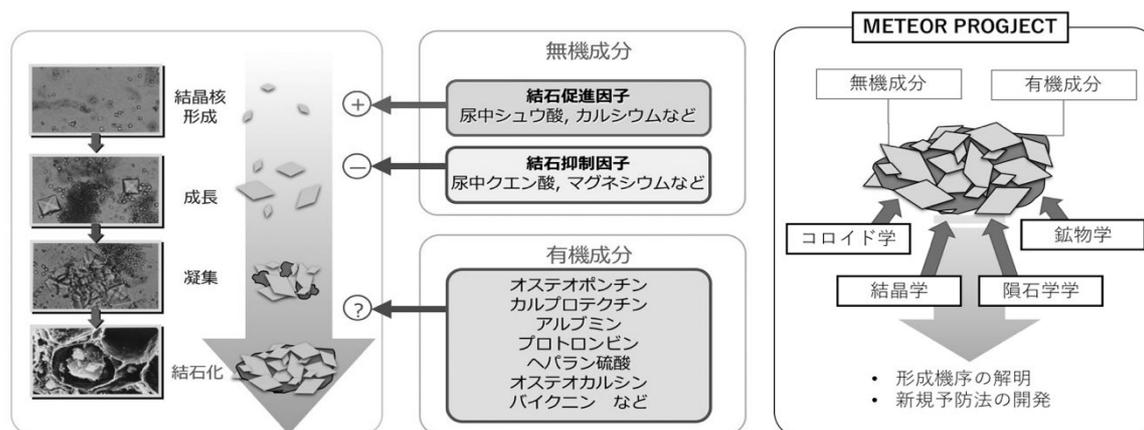
研究分野：泌尿器科

キーワード：尿路結石 オステオポンチン マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

わが国における尿路結石の生涯罹患率は 12%に達し、今や国民病となった。これまで尿路結石の予防は、飲水、食事指導による尿中無機成分の制御が主体であったが、5年再発率は約 50%と高い。その形成は、結晶核形成 成長 凝集 石灰化の過程を経ると考えられており、無機あるいは有機成分が放射状・層状に成長する構造を示す。私たちは、尿路結石に数%含まれる有機成分が結晶の成長過程に大きく影響を及ぼす可能性があると考え、結石形成に関与するマトリックス蛋白を同定し、その分子機序の解明に成功してきた。しかし、尿路結石の形成過程における構造変化の詳細な機序は未だ解明されていない。また、脆弱な有機物質を含んだ結石の分析用試料の作製技術は確立されず、発展的な研究には至らなかった。

そのような閉塞感がある状況において、大阪大学工学研究科・森勇介教授との会談から、理学部や工学部で実施されている鉱物・隕石の分析技術や結晶成長技術が、結石の形成過程解明に極めて有効である可能性に気づいた。そこで私たちは、共同研究として医工連携共同研究プロジェクト (METEOR (Medical and Engineering Tactics for Elimination Of Rocks) Project) を設立した。本プロジェクトは、鉱物学・隕石学で培われた知見・技術を応用することで、これまで未開拓であった尿路結石構造に関する新たな研究分野を提供するという発展性を持つ(下図)。初期実験からは、既知の結石形成過程とは異なる、溶媒媒介相転移が関わる結石形成過程が存在する可能性が明らかになってきた。したがって、この溶媒媒介相転移依存性の結石形成過程を抑制することによって、その高い硬度が破碎治療の妨げになっている尿路結石の生成を制御できる可能性があるとのアイデア着想に至った。本医工連携プロジェクトは、これまでの結石研究とは全く異なるアプローチにより、尿路結石の形成機序を解明できることが期待される。



## 2. 研究の目的

わが国における尿路結石の生涯罹患率は 12%にまで増加したが、有効な予防薬は開発されていない。私たちは、尿路結石マトリックス蛋白オステオポンチン(OPN)を同定したが、結石の形成過程の詳細な機序を解析する技術は確立されていない。そこで、鉱物・隕石学の分析技術や結晶成長技術が、尿路結石の形成過程解明にいかすことができるとのアイデアのもとに大阪大学工学部との医工連携プロジェクトを私たちは開始した。

本研究の目的は、ヒトの尿路結石から、(1)結石薄片を用いた全く新しい解析方法を確立、(2)

無機あるいは有機成分の分布情報と核形成から結石の成長過程における構造変化などの情報を抽出、(3)鉱物学・隕石学的プロファイリングによって尿路結石の形成機序を解明することである。最終ゴールは、この成果を新規予防法の創生につなげることである。

### 3. 研究の方法

#### 【研究1】尿路結石を構成する無機分子の構造・分布解析

偏光顕微鏡による結晶構造の観察:10 サンプルのシュウ酸カルシウム結石から、平面研磨によって作製した厚さ 20  $\mu\text{m}$  の薄片を使用し、尿路結石の結晶構造を偏光顕微鏡で観察した。

フーリエ変換赤外分光分析 (FT-IR) による無機成分の分布構造解析:同じくシュウ酸カルシウム結石の薄片を使用し、FT-IR を用いて無機成分 (シュウ酸カルシウム一水和物 (COM) と二水和物 (COD)) の分布構造を解析した。

蛍光免疫染色による有機成分の分布構造解析:

蛍光免疫染色を用いて、尿路結石の薄片に含まれる有機成分 (osteopontin (OPN)、Renal prothrombin fragment 1 (RPTF-1)、calgranulin A (Cal-A)) の分布構造を解析した。

#### 【研究2】尿路結石を構成するオステオポンチンの機能解析

さらに、【研究1】で明らかになった分子の中で OPN に着目した。役割を調べるために、siRNA でマウス腎皮質集合管細胞 (M-1) 細胞の OPN をノックダウンさせた系 (KD) と対照系 (WT) を準備し、シュウ酸カルシウム結晶の付着量を比較した。また、マウス M 細胞 (RAW264.7) との共培養を行い、M の影響も調べた。

さらに、OPN-BMDM (OPN 欠損マウスから採取した BMDM) と OPN+BMDM (比較のために通常のマウスから採取した BMDM) を使用し、シュウ酸カルシウム一水和物 (COM) の付着量、炎症遺伝子 (IL6、Tnf)、細胞接着因子遺伝子 (Intgav、Intb3) を評価した。また、IPA ソフトウェアを用いて機能アノテーションを行い、同定されたペプチドの発現倍率の値を決定し、コア IPA 解析を行った。

### 4. 研究成果

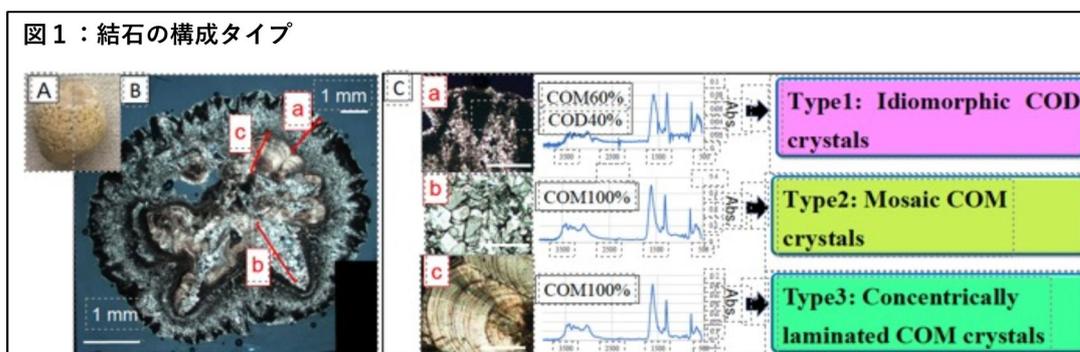
#### 【研究1】尿路結石を構成する無機分子の構造・分布解析

偏光顕微鏡による観察から、尿路結石の中心部では層状構造を持つ結晶領域 (A)、直径 50  $\mu\text{m}$  の結晶から成る領域 (B)、辺縁部では直径 10  $\mu\text{m}$  以下の結晶から成る領域 (C) に分類できることが明らかになった。領域 (A) と (B) には、シュウ酸カルシウム一水和物 (COM) が 99% 含まれており、領域 (C) には二水和物 (COD) が 40% 含まれていることが分かった。

また領域 (A) には OPN と RPTF-1 のみが層状かつ均一な間隔で分布していることが明らかになった。一方、領域 (B) と (C) では、OPN と RPTF-1 は結晶内に分布しており、Cal-A は結晶粒界に分布していることが示された。

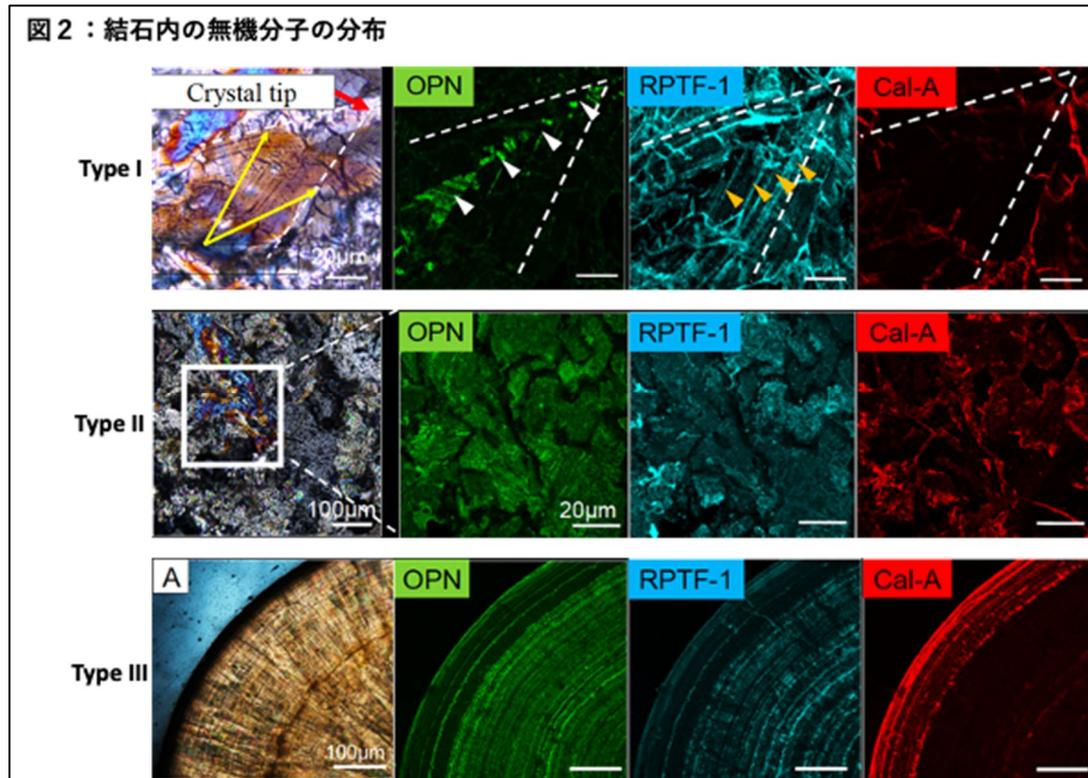
さらに、10 サンプルの追加分析から、尿路結石を構成する COM と COD 結晶の種類、およびそれ

図1: 結石の構成タイプ



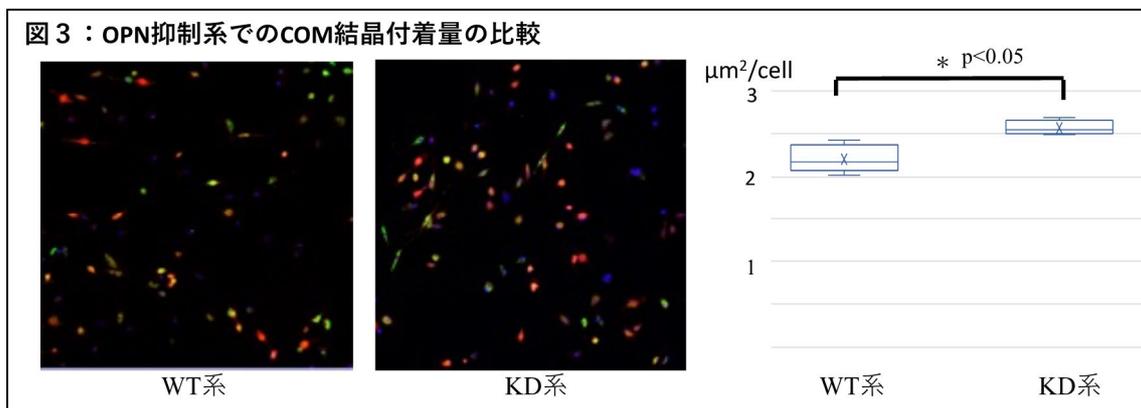
それぞれの結晶サイズ・構造の類似性に基づいて、4つのタイプに分類された。結石中心部には顆粒状領域 (Type1) とモザイク状領域 (Type2) が存在し、辺縁部には層構造領域 (Type3) と COD 結晶領域 (Type4) が確認された。

これらの研究結果から、無機成分の構造解析により COD、不均一構造 COM、層構造 COM の3つの結晶構造が同定された。また、有機成分の構造解析からは OPN と RPTF-1 が結晶内に分布し、特定の結晶面に偏在することが明らかになった。さらに、Cal-A は結晶外に分布し、結晶間の空隙の層に局在していることが示された。



### 【研究2】尿路結石を構成するオステオポンチンの機能解析

単培養群の COM 付着量は、WT・KD 系でそれぞれ  $2.34 \pm 0.61$ ・ $2.10 \pm 0.79 \mu\text{m}^2/\text{個}$ であった ( $p=1.00$ )。共培養では、WT 系の COM 付着が  $0.57 \pm 0.12 \mu\text{m}^2/\text{個}$ と単培養群よりも低下したが ( $p<0.001$ )、KD 系の COM 付着は  $2.10 \pm 0.79 \mu\text{m}^2/\text{個}$ と単培養群と差はみられなかった ( $p=1.00$ )。M-1 細胞では、OPN の発現は単培養群で変化を認めず、共培養群の 12 時間、24 時間で、17.3 倍 ( $p<0.01$ )、12.5 倍 ( $p<0.01$ ) と有意な増加を認めた。



結晶接着量は OPN + -BMDM で  $2.17 \mu\text{m}^2/\text{細胞}$ 、OPN - -BMDM で  $2.55 \mu\text{m}^2/\text{細胞}$ であった ( $P < 0.05$ )。OPN-BMDM における遺伝子の発現は、OPN+-BMDM に比べ、Il6 : 0.34 倍 ( $P < 0.05$ )、Tnf : 0.65 倍

( $P = 0.19$ ) Intgav : 0.80 倍 ( $P = 0.41$ ) Intgb3 : 1.61 倍 ( $P < 0.05$ ) であった。IPA コア解析の結果、CREB 及び S100 Family Singaling、Phagosome Formation、Stahimin1 関連の乳癌制御など、複数の経路の抑制を認めた。

これらの結果から、OPN が結晶構造に重要な蛋白であると同時に、その由来として M などの免疫細胞系のシグナル伝達や貪食機能を制御することで結晶形成に関わることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Unno R, Taguchi K (Contributed equally), Hosier G, Usawachintachit M, Sui W, Yang H, Hamouche F, Bayne D, Stoller M, Chi T	4. 巻 41
2. 論文標題 Maternal family history of urolithiasis is associated with earlier age of onset of stone disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 World J Urol	6. 最初と最後の頁 241-247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00345-022-04221-x. Epub 2022 Dec 11	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sugino T, Taguchi K (corresponding author), Unno R, Hamamoto S, Ando R, Okada A, Yasui T	4. 巻 12
2. 論文標題 Microdamage analysis of single-use flexible ureteroscope immediately after lithotripsy use	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 18367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-23345-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Taguchi K, Okada A, Unno R, Hamamoto S, Yasui T	4. 巻 16
2. 論文標題 Macrophage Function in Calcium Oxalate Kidney Stone Formation: A Systematic Review of Literature	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 673690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.673690	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Yutaro, Maruyama Mihoko, Okada Atsushi, Furukawa Yoshihiro, Momma Koichi, Sugiura Yuki, Tajiri Rie, Sawada Koichi P., Tanaka Shunichi, Takano Kazufumi, Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Tsukamoto Katsuo, Yoshimura Masashi, Mori Yusuke, Yasui Takahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Multicolor imaging of calcium-binding proteins in human kidney stones for elucidating the effects of proteins on crystal growth	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-95782-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Taguchi K, Hamamoto S, Okada A, Tanaka Y, Sugino T, Unno R, Kato T, Ando R, Tozawa K, Yasui T	4. 巻 20
2. 論文標題 Low bone mineral density is a potential risk factor for symptom onset and related with hypocitraturia in urolithiasis patients: a single-center retrospective cohort study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Urology	6. 最初と最後の頁 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12894-020-00749-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Taguchi K, Chen L, Usawachintachit M, Hamamoto S, Kang M, Sugino T, Unno R, Tzou DT, Sherer BA, Okada A, Yasui T, Ho SP, Stoller ML, Chi T	4. 巻 97
2. 論文標題 Fatty acid-binding protein 4 downregulation drives calcification in the development of kidney stone disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 1042-1056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2020.01.042	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 該当する

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 丸山 美帆子, Sahil Dwivedi, 佐々木 勇和, 安藤 亮介, 田口 和己, 瀧本 周造, 高野 和文, 吉川 洋史, 吉村 政志, 安井 孝周, 森 勇介
2. 発表標題 AI を用いた経皮的経尿道的同時碎石術後に再発リスクの高い結石成分の同定
3. 学会等名 日本尿路結石症学会第32回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部 竜也, 田口 和己, 鳥居 孝英, 須江 保仁, 磯谷 正彦, 茶谷 亮輔, 岡田 朋記, 河瀬 健吾, 田中 勇太郎, 杉野 輝明, 瀧本 周造, 安藤 亮介, 岡田 淳志, 安井 孝周
2. 発表標題 マクロファーゼにおける結晶付着および結晶貪食のオステオポンチンの機能解析
3. 学会等名 日本尿路結石症学会第32回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 茶谷 亮輔、田口 和己、須江 保仁、服部 竜也、磯谷 正彦、岡田 朋記、河瀬 健吾、田中 勇太郎、杉野 輝明、瀧本 周造、宇佐美 雅之、安藤 亮介、岡田 淳志、戸澤 啓一、岡田 随象、安井 孝周
2. 発表標題 ヒトとモデル動物における尿路結石症のマルチオミクス解析
3. 学会等名 日本尿路結石症学会第32回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田口 和己
2. 発表標題 結石を溶かす:尿路結石診療のイノベーションを目指して
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taguchi Kazumi, Unno Rei, Sugino Teruaki, Kawase Kengo, Heiko Yang, Hamamoto Shuzo, Okada Atsushi, Marshall Stoller, Yasui Takahiro, Tom Chi
2. 発表標題 FATTY ACID BINDING PROTEIN 4 ATTENUATES MACROPHAGE AND TUBULAR CELLS CRYSTAL PHAGOCYTOSIS TO DRIVE RENAL CALCIUM OXALATE STONE DEVELOPMENT
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2021(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 勇太郎、岡田 淳志、丸山 美帆子、吉川 善博、田尻 理恵、門馬 綱一、杉浦 悠紀、田口 和己、瀧本 周造、吉村 政志、森 勇介、安井 孝周
2. 発表標題 多重免疫染色法を応用した尿路結石形成におけるCalcium-Binding Proteinの機能解明
3. 学会等名 日本尿路結石症学会第31回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田口 和己
2. 発表標題 骨代謝の改善からみた尿路結石症の治療戦略
3. 学会等名 日本尿路結石症学会第31回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田口 和己、瀧本 周造、岡田 淳志、河瀬 健吾、岡田 朋記、茶谷 亮輔、加藤 大貴、広瀬 真仁、遠藤 純夫、坂倉 毅、安藤 亮介、戸澤 啓一、郡 健二郎、安井 孝周
2. 発表標題 骨密度が影響を及ぼす尿路結石症患者の臨床アウトカムの横断的および縦断的関連解析
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田口 和己、河瀬 健吾、杉野 輝明、海野 怜、瀧本 周造、安藤 亮介、岡田 淳志、安井孝周
2. 発表標題 尿路結石の発症に関わるfatty acid binding protein 4の同定と機能解析
3. 学会等名 第29回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 勇太郎、岡田 淳志、丸山 美帆子、田口 和己、瀧本 周造、森 勇介、郡 健二郎、安井 孝周
2. 発表標題 隕石学的技術を応用した二次元マッピング法による腎結石の構造解析
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉野 輝明、田中 勇太郎、海野 怜、田口 和己、瀧本 周造、安藤 亮介、岡田 淳志、安井 孝周
2. 発表標題 尿路結石症の未来へ～基礎研究から予防を再考する～
3. 学会等名 第70回日本泌尿器科学会中部総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田口 和己、瀧本 周造、岡田 淳志、安井 孝周
2. 発表標題 尿路結石形成に関わる遺伝子ネットワークの同定と溶解治療への可能性
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taguchi Kazumi, Chen Ling, Hamamoto Shuzo, Sugino Teruaki, Kang Misun, Unno Rei, Benjamin A Sherer, Manint Usawachintachit, David T Tzou, Okada Atsushi, Sunita P Ho, Marshall L Stoller, Yasui Takahiro, and Thomas Chi
2. 発表標題 Fatty acid binding protein 4 drives calcification in the development of kidney stone disease
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 田口 和己、服部 竜也、杉野 輝明、瀧本 周造、岡田 淳志、安井 孝周	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 7
3. 書名 尿路結石の形成機序の新展開-マクロファージと免疫機能	

〔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	安藤 亮介  (ando ryosuke)  (30381867)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授    (23903)	
研究分担者	安井 孝周  (yasui takahiro)  (40326153)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授    (23903)	
研究分担者	岡田 淳志  (okada atsushi)  (70444966)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授    (23903)	
研究分担者	濱本 周造  (hamamoto shuzo)  (80551267)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師    (23903)	

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