

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791519

研究課題名（和文） 腎尿細管細胞の微細構造変化と酸化ストレス発生からみた尿路結石形成機序の解明

研究課題名（英文） The elucidation of the kidney stone formation mechanism from a microstructural change and the oxidative stress of the renal tubular epithelial cell.

研究代表者

広瀬 真仁（HIROSE MASAHIRO）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：70529172

研究成果の概要（和文）：

本研究の成果は、いままでは明らかになっていなかった尿路結石形成初期における腎尿細管細胞と細胞障害との関連性を明らかにし、腎尿細管細胞内のミトコンドリアの係わった細胞障害、オステオポンチンの関連性、重要性を明らかにするものであり、本研究からミトコンドリア保護による細胞障害の抑制、および、オステオポンチン発現の抑制を通じた新たな尿路結石予防の可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In the early period of kidney stone formation the relations the renal tubular epithelial cell and the cell injury did not become clear until now. However, we clarified it in this study. We clarified the cell injury related mitochondria in the renal tubular cell, and importance of osteopontin relation in the early period of kidney stone formation. For these results of this study, a possibility of a new kidney stone therapy was recognized through the cell injury inhabitation by mitochondrial protection and the control of the osteopontin expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：尿路結石症、腎尿細管微細構造、細胞障害、ミトコンドリア、オステオポンチン

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

尿路結石治療の現状：尿路結石の生涯罹患率は、食生活の欧米化に伴い、わが国で男性15.1%、女性6.8%と上昇し、欧米では20%に達する国もある。2005年の尿路結石全国疫学調査での年間罹患率は、10万人あたり男性

192.0、女性79.3で、40年前に比べ約3倍に激増している。尿路結石の5年再発率は40-50%と非常に高く、尿路結石患者には劇的な疼痛発作がいつ訪れるか常に不安が付きまとい、また発症が生産年齢の男性に多く、社会的、経済的な損失は過大である。体外衝撃波結石破碎術（ESWL）は、低侵襲で容易な

治療を可能にしたが、その容易さのために、尿路結石の発症予防意識が薄れており、高い再発率の原因のひとつにもなっている。医療費削減の問題からも、結石の予防に努めるべきであるが、飲水以外の再発予防法は開発されておらず、尿路結石症の成因の究明と再発予防法の確立は急務である。

結石マトリックス: 尿路結石は95%の無機物質と、数%の有機物質から構成されている。無機物質のうち、尿中シュウ酸濃度が結石形成に重要と考えられ、食事中的シュウ酸摂取制限や飲水指導による再発予防が行われてきた。数%の有機物質が、尿路結石形成に大きく関与していると考えられるようになり、私たちは、そのひとつとしてオステオポンチン (OPN) を同定した。さらに OPN が尿路結石内有機物質の主成分であること、腎虚血や感染に対し、組織保護作用を持つことなどを明らかにした。OPN は骨基質蛋白の一つで、RGD 部位やカルシウム接着部位をもち、動脈硬化や、血管の石灰化にも関与していることが報告されている。しかし、OPN の結石形成における機能の詳細は明らかではない。

尿路結石症研究におけるモデル動物: までの尿路結石研究では、無機成分の大部分を占めるシュウ酸に着目し、シュウ酸の前駆物質を投与した結石モデルラットが使用されてきた。近年、遺伝子組み換えマウスを用いた研究が広く行われているが、対象となる結石モデルマウスの報告がなかった。私達は、シュウ酸の前駆物質であるグリオキシル酸を C57/BL6 マウスに連日腹腔内投与することで、結石モデルマウスを確立した。

尿路結石での腎尿細管細胞障害: 私達は、細胞障害がシュウ酸カルシウム結晶と培養尿細管細胞の接着を促進することや、結石モデルラットや腎尿細管培養細胞への細胞障害抑制物質の投与が結石形成を抑制することを報告し、結石形成では腎尿細管細胞障害が重要であると考えられるようになってきている。しかし、どのような細胞内機序で細胞障害が尿路結石を起こすのかは不明である。また、結石形成初期にはミトコンドリアなど細胞内小器官の形態変化が起こることを明らかにし、ミトコンドリアは細胞障害、酸化ストレスに関与している活性酸素種の発生源で、尿路結石形成を抑制するクエン酸の代謝にも関与していることから、ミトコンドリアの形態変化が尿路結石に係わっていると推測される。

尿路結石形成初期の機序 (推定): 上記より、微小な細胞障害が引き起こすミトコンドリアの形態変化が酸化ストレスを発生し、さ

らに細胞障害を誘起し、結石形成をおこしやすい腎環境を創り出すと考え、本研究を企画した。

2. 研究の目的

本研究は、尿路結石形成における腎尿細管細胞の微細構造の変化と結石マトリックスの局在と動態を検討することで、結石形成初期における細胞内の分子生物学的機序を解明し、新たな結石予防法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

尿路結石の形成機序を以下の方法で明らかにし、再発予防法の開発を行った。

- (1) 尿路結石の形成初期における腎尿細管細胞の微細構造の形態変化を、主に透過型電子顕微鏡を用いて、経時的に詳細に検討した。
- (2) ミトコンドリアの形態変化と酸化ストレス物質の発現と局在、細胞障害の発生の関連を免疫染色法を用いて形態学的に検討した。
- (3) 電子顕微鏡を用いた結石マトリックス OPN 免疫染色で、OPN の局在と動態を詳細に検討した。さらに、OPN ノックアウトマウスの微細構造の変化を検討した。

4. 研究成果

2009年度に行った研究は、(1) 結石形成初期の微細構造変化の検討、(2) 結石形成初期のミトコンドリア変化、酸化ストレス、細胞障害の関連性の検討、(3) 電子顕微鏡を用いた OPN の免疫染色法の確立である。

(1) に関しては、結石モデルマウスを用い、結石形成初期過程で経時的に、詳細に検討した。結石形成モデルマウスの微細構造は、まずミトコンドリアの変形がおり、尿細管細胞、微絨毛の崩壊、尿細管管腔内への崩壊物質の脱落、そして崩壊物質が凝集することで結晶核の形成を起こしていることが明らかになった。

(2) に関しては、免疫染色法を用いて、細胞障害、酸化ストレスの関連物質を(1)と同様の結石モデルを用い、形成初期について検討した。酸化ストレス、細胞障害は結石形成前に出現しており、ミトコンドリアの脂質二重膜への刺激により、酸化ストレスや細胞障害が発生していると考えられた。これが原因で尿細管細胞での微細構造レベルの変化が起こり、結石形成につながるものと考えられた。

(3) に関しては、組織の固定、包埋、重合、染色条件、標識するコロイド粒子の条件などを検討し、OPN の免疫染色法を確立した。

今年度行った研究の成果はいままで明らかになっていなかった尿路結石形成初期の機序を明らかにし、ミトコンドリアの係わった細胞障害、酸化ストレスの関連性、重要性を明らかにするものであり、ミトコンドリア保護を通じた新たな尿路結石予防の可能性が考えられた。

2010年度に行った研究は、(1)結石形成初期の微細構造の変化と細胞障害の関連の検討、(2)結石初期過程でのOPN機能の解明、(3)結石形成予防法の開発である。

(1)では、結石形成マウス・細胞障害を抑制するために抗酸化作用を持つ緑茶を投与したマウスを用い、結石形成初期を経時的に検討した。結石形成マウスでは、ミトコンドリア、尿細管細胞、微絨毛の崩壊が起き、崩壊物質が尿細管腔内へ脱落した後、これらが凝集して結晶核の形成に至ることがわかった。細胞障害抑制により、これらの変化が緩やかになり、結石形成量が減少した。

(2)では、OPNの経時的な発現部位の変化、量を検討した。OPNは結石形成前の崩壊した尿細管細胞周囲に発現し、崩壊物質とともに管腔内へ逸脱した後、結晶核内に認められた。OPNノックアウトマウスでは、崩壊物質が結晶核にならなかった。以上から結石形成初期でOPNは、管腔内で崩壊した細胞内小器官を凝集させ、結晶核の形成を促進し、さらに大きな結晶を形成させる可能性が示唆された。

(3)では、緑茶を投与することで、細胞崩壊・ミトコンドリア変化・OPN発現・結石形成の抑制が認められた。細胞形態およびミトコンドリアの変化、OPN発現の抑制が結石予防に重要であると思われた。

本研究の成果はいままで明らかになっていなかった結石形成初期における細胞障害の関連性を明らかにし、ミトコンドリアの係わった細胞障害、OPNの関連性、重要性を明らかにするものであり、抗酸化物質を用いてのミトコンドリア保護、OPN発現抑制を通じた新たな尿路結石予防の可能性が考えられた。

図1: 尿路結石形成初期における尿細管細胞、ミトコンドリアの変化とOPNの作用

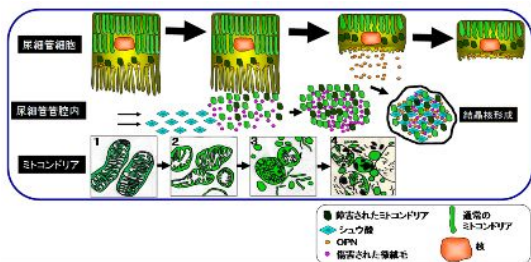
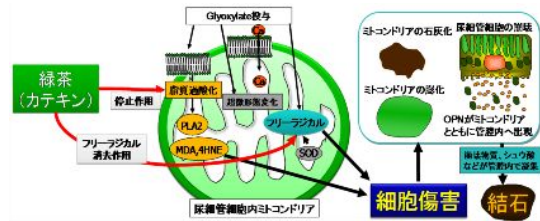


図2: 尿路結石形成初期における細胞障害の作用および抗酸化物質による結石抑制作用機序



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1件)

- ① Masahito Hirose, Takahiro Yasui, Atsushi Okada, Shuzo Hamamoto, Hideo Shimizu, Yasunori Itoh, Keiichi Tozawa, Kenjiro Kohri: Renal tubular epithelial cell injury and oxidative stress induce calcium oxalate crystal formation in mouse kidney. International Journal of Urology, 17: 83-92, 2010, 査読あり

[学会発表] (計3件)

- ① 広瀬真仁、中岡和徳、藤井泰普、新美和寛、廣瀬泰彦、小林隆宏、濱本周造、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: 緑茶の細胞傷害抑制効果から明らかになった「腎尿細管細胞傷害の尿路結石形成初期における役割」。第98回日本泌尿器科学会総会(盛岡市)、2010年4月28日
- ② 広瀬真仁、藤井泰普、新美和寛、小林隆宏、濱本周造、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: 尿路結石形成初期におけるミトコンドリア崩壊を介した腎尿細管細胞傷害に対する緑茶の抑制効果。第59回日本泌尿器科学会中部総会(金沢市)、2009年10月30日
- ③ 広瀬真仁、廣瀬泰彦、小林隆宏、濱本周造、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石増大作用～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(岡山市)、2009年4月17日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

広瀬 真仁 (HIROSE MASAHITO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・
研究員
研究者番号：70529172

(4) 研究協力者

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

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

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

濱本 周造 (HAMAMOTO SHUZO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・
臨床研究医
研究者番号：80551267

宇佐美 雅之 (USAMI MASAYUKI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・
研究員
研究者番号：30534755