

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791484

研究課題名（和文） 尿路結石形成初期におけるミトコンドリア障害の関与とそのメカニズムの解明

研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism and involvement of mitochondrial collapses in the initial process of kidney stone formation

## 研究代表者

新美 和寛 (NIIMI KAZUHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：70551274

研究成果の概要（和文）： 私たちは、結石モデル動物に CsA を投与することで結石の形成が有意に抑制されることを明らかにした。また、mPTP 開口を阻止してミトコンドリア傷害を予防することで酸化ストレスの発生やアポトーシスを抑制することに成功した。これらの結果から尿路結石の初期形成では、cyclophilin D 活性を介した mPTP の開口が酸化ストレスやアポトーシスの起因となり腎尿細管細胞傷害の原因となることが明らかになった。本研究は、尿路結石症の新規治療薬の開発に応用できると考えられた。

研究成果の概要（英文）： We have shown that the kidney stone formations are significantly suppressed by the administration of CsA. In addition, we have succeeded in suppressing apoptosis and generation of oxidative stress by preventing mitochondrial collapses by blocking the mPTP opening. The result of this study showed that the mPTP opening via cyclophilin D activity induced the renal tubular cell injury through the apoptosis and oxidative stress in the initial process of kidney stone formations. I thought that this study can be applied to the development of new therapeutic agents for kidney stone disease.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：アポトーシス、シクロスポリン、ミトコンドリア、尿細管細胞傷害、酸化ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

尿路結石の形成を促進させる腎尿管細胞傷害は、酸化ストレスやアポトーシスが原因となりミトコンドリアが関与すると考えられているが、未だ詳細なメカニズムは明らかになっていない。心臓、肝臓では、ミトコンドリア二重膜に存在する Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) の開口がミトコンドリアを介した細胞傷害の起因となることが報告されている。

### 2. 研究の目的

今回、私たちは mPTP 開口がミトコンドリア内膜側に存在する cyclophilin D の活性に依存していることに着目し、尿路結石形成時における腎尿管細胞傷害のメカニズムについて *in vitro* および *in vivo* 研究で検討した。

### 3. 研究の方法

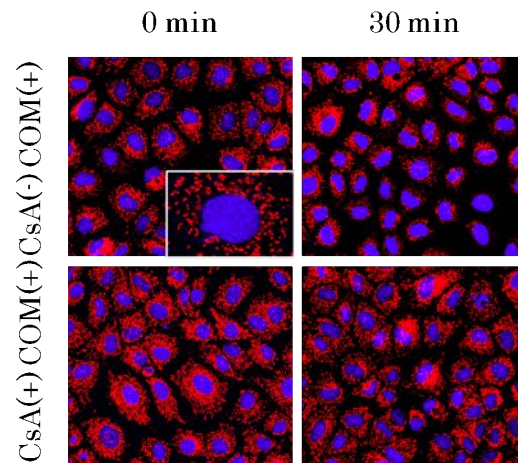
(1) *in vitro* 研究 ; ラット腎尿管培養細胞 (NRK52-E) にシュウ酸カルシウム水和物 (COM) 結晶 ( $100\mu\text{m}^2$ ) を添加した。cyclophilin D 活性阻害作用を有するシクロスポリン (CsA) ( $2\mu\text{M}$ ) 投与群と非投与群とで、酸化ストレスマーカーである superoxide dismutase (SOD) および 4-HNE の発現を western blotting で、ミトコンドリア傷害については tetramethylrhodamin ethyl ester によるミトコンドリア染色により経時的に観察した。

(2) *in vivo* 研究 ; 8 週齢雄の Sprague - Dawley ラットに 1% エチレングリコール (EG) を自由飲水で投与し結石モデルラットを作成した。CsA を 2.5, 5, 10.0 mg/kg/day の濃度に振り分け結石モデルラットへ胃管投与し、7, 14 日目に腎、血液および 24 時間尿を採取した。結石形成については Pizzolato 染色および偏光顕微鏡で観察し、腎断面積あたりの結石占有面積比で定量化した。ミトコンドリアの形態については透過型電子顕微鏡で検討した。また、酸化ストレスや細胞傷害については、酸化ストレスマーカーである superoxide dismutase ( SOD ) 、

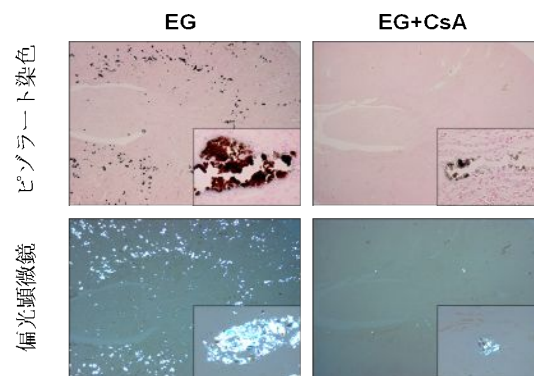
malondialdehyde ( MDA ) 、 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)、ミトコンドリアを介したアポトーシス関連蛋白である cytochrome c および cleaved caspase 3 をそれぞれ免疫組織染色で検討した。

### 4. 研究成果

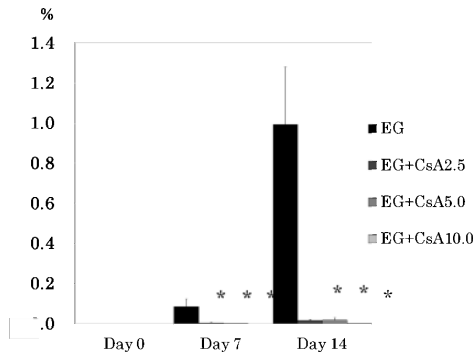
(1) *in vitro* 研究 ; COM 結晶を添加後、SOD の発現は低下、4-HNE の発現は増加し、ミトコンドリアの染色強度は経時的に低下した。一方、CsA 投与により COM 結晶添加後も SOD および 4-HNE の発現やミトコンドリアの染色強度に変化は見られなかった。



(2) *in vivo* 研究 ; CsA 非投与群 (EG) では腎の皮髄境界部を中心に結石形成が認められ、ミトコンドリアの二重膜は断裂し、内部不正な構造を示した。また、SOD は発現低下、MDA、8-OHdG、cleaved caspase 3 は発現増加を示した。一方、CsA 投与群 (EG+CsA) では結石形成が CsA 非投与群と比べて有意に減少し、

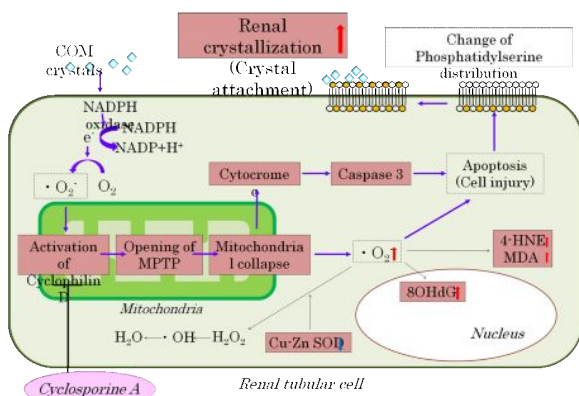


(CsA 非投与 ; 0.994% ± 0.287、  
CsA2.5mg/kg/day ; 0.018% ± 0.004、  
CsA5.0mg/kg/day 投与 ; 0.019% ± 0.013、  
CsA10.0mg/kg/day 投与 ; 0.002% ± 0.001)



ミトコンドリアは二重膜が保たれた正常な形態を示した。また、CsA 非投与群と比較し SOD は発現増加、MDA、8-OHdG、cleaved caspase 3 は発現が有意に低下していた。CsA の濃度間に有意な差は認めなかった。

私たちは、CsA 投与することで結石の形成が有意に抑制されることを明らかにした。また、mPTP 開口を阻止してミトコンドリア傷害を予防することで酸化ストレスの発生やアポトーシスを抑制することに成功した。これらの結果から尿路結石の初期形成では、cyclophilin D 活性を介した mPTP の開口が酸化ストレスやアポトーシスの起因となり腎尿管細胞傷害の原因となることが明らかになった。本研究は、尿路結石症の新規治療薬の開発に応用できると考えられた。



## 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 1 件)

- ① Niimi K, Yasui T, Hirose M, Hamamoto S, Itoh Y, Okada A, Kubota Y, Kojima Y, Tozawa K, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. Mitochondrial permeability transition pore opening induces the initial process of renal calcium crystallization. Free Radic Biol Med. 査読あり 2012, 52:1207-17. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.005.

[学会発表] (計 12 件)

- ① Niimi Kazuhiro, Yasui Takahiro, Hirose Yasuhiko, Hamamoto Shuzo, Kobayashi Takahiro, Hirose Masahito, Okada Atsushi, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Activation of cyclophilin D induces the initial process of kidney stone formation via mitochondrial permeability transition pore opening. 第 32 回国際泌尿器科学会 (SIU)、2012.9.30-10.4、福岡市
- ② Niimi Kazuhiro, Yasui Takahiro, Hirose Masahito, Okada Atsushi, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Prevention mechanism of green tea on renal stone formation. 第 32 回国際泌尿器科学会 (SIU)、2012.9.30-10.4、福岡市
- ③ 新美 和寛、安井 孝周、田口 和己、藤井 泰普、廣瀬 泰彦、小林 隆宏、濱本 周造、広瀬 真仁、岡田 淳志、伊藤 恭典、戸澤 啓一、郡 健二郎: 尿路結石の初期形成に係わるミトコンドリア崩壊のメカニズムと治療への応用～分子標的治療薬 NIM811 の開発～。日本尿路結石症学会第 22 回学術集会、2012.8.24-25、浜松市
- ④ 新美 和寛、安井 孝周、岡田 淳志、戸澤 啓一、佐々木 昌一、林 祐太郎、郡 健二郎: 尿路結石の初期形成における腎尿管細胞傷害のメカニズム解明と新たな治療法への応用。第 156 回名古屋市立大学医学会例会、2012.6.19
- ⑤ 新美 和寛: 尿路結石の形成におけるミ

- トコンドリア cyclophilin D の機能解析。第 55 回日本腎臓学会学術総会、2012. 6. 1-3、横浜市
- ⑥ 新美 和寛：腎尿管細胞の傷害から見たオステオポンチンの役割。第 100 回日本泌尿器科学会総会、2012. 4. 21-24、横浜市
- ⑦ 新美 和寛、安井 孝周、市川 潤、田口 和己、藤井 泰普、廣瀬 泰彦、小林 隆宏、濱本 周造、広瀬 真仁、岡田 淳志、伊藤 恭典、戸澤 啓一、郡 健二郎：尿路結石の初期形成における Mitochondrial Permeability Transition Pore 開口の作用機序とその予防法の確立。第 100 回日本泌尿器科学会総会、2012. 4. 21-24、横浜市
- ⑧ 新美 和寛、安井 孝周、田口 和己、藤井 泰普、濱本 周造、広瀬 真仁、岡田 淳志、伊藤 恭典、戸澤 啓一、郡 健二郎：尿路結石におけるミトコンドリア Cyclophilin D の機能解明。第 21 回泌尿器科分子・細胞研究会、2012. 2. 11、札幌市
- ⑨ Niimi Kazuhiro, Yasui Takahiro, Taguchi Kazumi, Fujii Yasuhiro, Hirose Yasuhiko, Kobayashi Takahiro, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Okada Atsushi, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Opening of mitochondrial permeability transition pores induces kidney stone formation. 1st Meeting of the EAU Section of Urolithiasis (EULIS), 2011. 9. 7-10, London (United Kingdom)
- ⑩ 新美 和寛、安井 孝周、藤井 泰普、小林 隆宏、濱本 周造、広瀬 真仁、岡田 淳志、伊藤 恭典、戸澤 啓一、郡 健二郎：ミトコンドリア傷害による尿路結石の初期形成機序の解明と Cyclosporine A を用いた結石抑制効果。第 54 回日本腎臓学会学術総会、2011. 6. 15-17、横浜市
- ⑪ 新美 和寛、安井 孝周、濱本 周造、岡田 淳志、小島 祥敬、梅本 幸裕、戸澤 啓一、郡 健二郎：ミトコンドリア傷害による尿路結石の初期形成機序

の解明と Cyclosporine A を用いた結石抑制効果。第 99 回日本泌尿器科学会総会、2011. 4. 21-24、名古屋市

- ⑫ 新美 和寛、安井 孝周、中岡 和徳、田口 和己、藤井 泰普、廣瀬 泰彦、小林 隆宏、濱本 周造、広瀬 真仁、岡田 淳志、伊藤 恭典、戸澤 啓一、郡 健二郎：ミトコンドリア傷害がもたらす尿路結石形成機序の解明とシクロスポリンによる抑制作用。日本尿路結石症学会第 20 回学術集会、2010. 8. 27-28、大阪市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新美 和寛 (NIIMI KAZUHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：70551274