

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592374

研究課題名(和文) 尿路結石症予防法の確立に向けた遺伝因子・環境因子両面からの横断的研究

研究課題名(英文) Cross sectional study from gene and environmental factor towards

研究代表者

伊藤 恭典 (Itoh, Yasunori)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：70295608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：私たちの最近の研究から、尿路結石症はメタボリックシンドロームの発症機序と似ていることがわかってきた。そこで、本研究ではその観点からみた尿路結石症予防法の確立をめざし、遺伝因子と環境因子の両面から基礎研究を行った。遺伝因子の研究として、OPN遺伝子のSNPs解析を行い、その結果と患者の背景・結石成分を比較し、再発リスクマーカーとなり得るSNPsを見つけ出した。環境因子の研究として、ストレス感受性シグナルであるNF- κ Bが増加し、ミトコンドリアが酸化ストレスにより傷害を受けたことを確認した。

研究成果の概要(英文)：Urolithiasis looks like metabolic syndrome about mechanism of generation. Then, we performed research for establishment of prevention for urolithiasis by considering metabolic syndrome from genetic and environmental factors. In genetic research, we analyzed SNPs of the OPN gene and compared their results to patients background and stone composition.

We found the specific SNPs as a risk marker for stone recurrence. In environmental research, we found that NF- κ B as a stress receptivity signal was increased and mitochondria was received injury by oxidative stress.

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 メタボリックシンドローム アディポサイトカイン ストレス感受性シグナル オステオポンチン 結石モデルマウス OPNノックアウトマウス OPNトランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

わが国における尿路結石の発生頻度は、第二次世界大戦後急増しており、その原因は高度経済成長に伴う食生活の欧米化やライフスタイルの変化と考えられている。上部尿路結石の発生頻度は、2005年の尿路結石症全国調査では年間男性192人、女性79人(対人口10万比)と1965年から倍増し、生涯罹患率は男性15.1%、女性6.8%まで増加するに至っている。最近、内臓脂肪蓄積の結果、各種の生活習慣病が集積するメタボリックシンドロームが注目され、あらためて生活習慣病への関心が高まっている。このなかで臨牀的に重要な点は、動脈硬化性疾患による心血管合併症への対策である。尿路結石症は動脈硬化症と疫学的に類似点が多く、形成機序も類似している。成因としてはそれぞれが尿酸、LDLで、形成場所がそれぞれ尿細管細胞、血管内皮細胞と異なるものの、好発年齢が中年男性や閉経後女性で、欧米化食生活の関与、石灰化成分、形成機序としてサイトカインの発現、マクロファージの遊走、カルシウムの他に結石マトリクスであるオステオポンチン(OPN)の存在などが両者の共通点として挙げられる。私たちは、腹部大動脈の石灰化をスコア化し、健常者と比較したところ、若年男性と高齢女性で結石患者に大動脈石灰化が多くみられた。

2. 研究の目的

私たちの最近の研究から、尿路結石症はメタボリックシンドロームの発症機序と似ていることがわかってきた。そこで本研究では、その観点からみた尿路結石症予防法の確立をめざし、遺伝因子と環境因子の両面から基礎研究を行う。特にメタボリックシ

ンドロームに關与するアディポサイトカイン・ストレス感受性シグナルの結石形成における役割を解明していくことが結石形成機序の解明と予防の手掛かりになると考えられ、尿路結石症研究の新たな道を拓くものとする。

3. 研究の方法

尿路結石形成において、OPNなどの結石関連物質の相互作用を調べる目的で、結石モデルマウス、OPNノックアウトマウス、OPN上流領域配列組み込みトランスジェニックマウスを用い、結石を形成させ、DNAマイクロアレイ解析を用い、結石形成時の発現遺伝子群と転写因子を同定し、各遺伝子の機能解析をRNA interference (RNAi)を用いて行う。

同定した結石患者に特異的な exon7 に SNPs をもつ OPN 遺伝子を結石モデルマウスの腎尿細管細胞に OPN 遺伝子導入し、OPN 遺伝子の発現様式、OPN 蛋白の細胞内局在、尿酸による細胞傷害作用および結石抑制効果を調べる。すでにラット腎尿細管細胞への遺伝子導入法を開発している。これらの成果をもとに遺伝子治療を、まずは結石モデルラットを用いた動物実験で開始する。遺伝子治療の効率と安全性についても確認する。

OPN のプロモーター領域で発見した結石患者に特異的な haplotype 遺伝子をクローニングし、尿酸カルシウム結晶接着による OPN 発現のプロモーター活性を調べる。また、OPN 以外の結石関連蛋白遺伝子の SNPs 解析をし、SNPs の結果と患者の背景(家族歴、食生活など)、結石成分を比較し、再発リスクマーカーとなり得る SNPs を見つけ出す。本研究ではこれら SNPs を用い、結石

形成の危険度を予知するゲノムスクリーニング検査を開発し、ゲノム創薬に結びつける。マイクロアレイ技術を利用した全ゲノム SNP 遺伝子型アッセイを用いて結石患者の遺伝子型判定を全遺伝子レベルで可能にする。

4. 研究成果

従来までの尿路結石の研究は、主に無機成分の観点から行われてきたが、私たちは遺伝子および蛋白の見地から行うことにより、結石形成機序を細胞レベルで解明してきた。尿路結石マトリックス成分のひとつとして OPN を同定し、結石形成の分子機構を解明してきた。その結果、従来までの「無機物質が過飽和になると尿路結石ができる」という概念を変えるとともに、OPN をはじめとする結石関連蛋白を遺伝子レベルで扱うようになった。

OPN の機能解析の目的でノックアウトマウスおよび OPN のプロモーター部位を -5.1Kb、-3.1Kb、-1.5kb で deletion した遺伝子をプロモーターとして蛍光発色する GFP 蛋白遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成した。そして、-3.1kb までが重要な役割を持つことを報告した。

従来までの結石形成モデル動物はラットのみであったが、モデルマウスの確立に成功した。このことから遺伝子組み換えマウスと比較することが可能となり、飛躍的に研究が進んだ。さらに vitro の結石形成モデルとして agarose ゲルを使用した三次元培養系で、細胞を用いた結石形成を確立した。この実験系は薬物投与による結石形成予防効果を確認する予備実

験を大量に行うことに適していた。

メタボリックシンドロームと尿路結石症の関連を検討する目的で、結石形成モデルラットを標準飼料群と High Fat Diet を与える高脂肪食群の 2 群に分けて、8 週齢より 8 週間各々を投与し、高脂肪食群においては中性脂肪・コレステロール・腹腔内脂肪増加を認め、腎組織所見では、高脂肪食群において EG 投与 1 週間で尿細管拡張と尿細管細胞管腔側に内張りするような結石形成が多く認められた。標準飼料群では EG 投与 2 週間で microlith は認めるものの内張りするような所見は認めなかった。メタボリックシンドロームでは酸化ストレスが亢進しており、結石形成機序において、ストレス感受性シグナルである NF- κ B は増加していた。また、ミトコンドリアが酸化ストレスにより傷害を受けたことが確認できた。本研究では、遺伝因子と環境因子の両面から尿路結石症の成因究明の研究を推し進めることにより、それらの関連性を明らかにしつつ、尿路結石の形成機序をさらに解明し、ゲノム遺伝子レベルからの新規の診断方法、予防法、治療薬の開発を行った。尿路結石の発生に遺伝因子と環境因子を関連させて基礎研究をし、治療・予防に結びつけようとする試みは今までになく、尿路結石研究の新たな道を拓くものと考えられた。

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 9 件) 全て査読あり。

1. Yasuhiko Hirose, Takahiro Yasui,

- Kazumi Taguchi, Yasuhiro Fujii, Kazuhiro Niim, Shuzo Hamamoto, Atsushi Okada, Yasue Kubota, Noriyasu Kawai, Yasunori Itoh, Keiichi Tozawa, Shoichi Sasaki, Kenjiro Kohri: Oxygen nano-bubble water reduces calcium oxalate deposits and tubular cell injury in ethylene glycol treated rat kidney. *Urolithiasis*, 41: 279-294, 2013
2. Takahiro Yasui, Atsushi Okada, Shuzo Hamamoto, Kazumi Taguchi, Ryosuke Ando, Kentaro Mizuno, Yasunori Itoh, Keiichi Tozawa, Yutaro Hayashi, Kenjiro Kohri: Efficacy of retroperitoneal laparoscopic ureterolithotomy for the treatment of large proximal ureteric stones and its impact on renal function. *Springerplus*, 2: 600, 2013
 3. Niimi Kazuhiro, Yasui Takahiro, Hirose Masahito, Hamamoto Shuzo, Itoh Yasunori, Okada Atsushi, Kubota Yasue, Kojima Yoshiyuki, Tozawa Keiichi, Sasaki Shoichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Mitochondrial permeability transition pore opening induces the initial process of renal calcium crystallization. *Free Radical Biology & Medicine*, 52:1207-1217, 2012
 4. Hirose Masahito, Tozawa Keiichi, Okada Atsushi, Hamamoto Shuzo, Higashibata Yuji, Gao Bin, Hayashi Yutaro, Shimizu Hideo, Kubota Yasue, Yasui Takahiro, Kohri Kenjiro: Role of osteopontin in early phase of renal crystal formation: immunohistochemical and microstructural comparisons with osteopontin knock-out mice. *Urological Research*, 40:121-129, 2012 (doi:10.1007/s00240-011-0400-z)
 5. Taguchi Kazumi, Okada Atsushi, Yasui Takahiro, Kobayashi Takahiro, Ando Ryosuke, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Pioglitazone, a peroxisome proliferator activated receptor agonist, decreases renal crystal deposition, oxidative stress and inflammation in hyperoxaluric rats. *Journal of Urology*, 188:1002-1011, 2012
 6. Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro, Okada Atsushi, Hirose Masahito, Hamamoto Shuzo, Fujii Yasuhiro, Niimi Kazuhiro, Taguchi Kazumi: Biomolecular mechanism of urinary stone formation involving osteopontin. *Urological Research*, 40:623-637, 2012
 7. Itoh Yasunori, Yoshimura Mugi, Niimi Kazuhiro, Usami Masayuki, Hamamoto Shuzo, Kobayashi Takahiro, Hirose Masahito, Okada Atsushi, Yasui Takahiro, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: The role of long-term loading of cholesterol in renal crystal formation. *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia*, 83:23-5, 2011
 8. Itoh Yasunori, Okada Atsushi, Yasui Takahiro, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Kojima Yoshiyuki, Tozawa Keiichi, Sasaki Shoichi, Kohri Kenjiro: Efficacy of selective 1A adrenoceptor antagonist silodosin in the medical expulsive therapy for ureteral stones. *International Journal of Urology*, 18:672-674, 2011
 9. Shuzo Hamamoto, Shintaro Nomura,

Takahiro Yasui, Atsushi Okada, Masahito Hirose, 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. 2011; 26, 439

[学会発表](計 3件)

1. Itoh Yasunori, Okada Atsushi, Yasui Takahiro, Ryosuke Ando, Taguchi Kazumi, Niimi Kazuhiro, Fujii Yasuhiro, Hirose Yasuhiko, Usami Masayuki, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Fujita Keiji, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Administration of the selective alpha 1A-adrenoceptor antagonist silodosin facilitates expulsion of size 5-10mm distal ureteral stones, as compared to control. 2nd Meeting of the EAU Section of Urolithiasis (EULIS), 2013.9.5-7, Copenhagen(Denmark), 2013.9.5. 発表
2. Yasunori Itoh, Atsushi Okada, Masahito Hirose, Shuzo Hamamoto, Takahiro Kobayashi, Kazuhiro Niimi, Yoshiyuki Kojima, Yasue Kubota, Takahiro Yasui, Keiichi Tozawa, Shoichi Sasaki, and Kenjiro Kohri Administration of the selective alpha 1A adrenoceptor antagonist silodosin facilitates expulsion of 1.5mm or larger distal ureteral stones, as compared to control. AUA 2012 Annual Meeting, Atlanta(USA) 2012.5.20-25. 2012.5.23. 発表

3. Itoh Yasunori, Okada Atsushi, Yasui Takahiro, Taguchi Kazumi, Niimi Kazuhiro, Fujii Yasuhiro, Hirose Yasuhiko, Usami Masayuki, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Fujita Keiji, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Efficacy of a selective alpha 1A adrenoceptor antagonist as a medical exclusive therapy against ureteral stones. 1st Meeting of the EAU Section of Urolithiasis (EULIS), 2011.9.7-10, London(United Kingdom), 2011.9.8. 発表

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 恭典 (ITOH 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

(2)研究分担者

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

岡田 淳志 (OKADA ATSUSHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：70444966

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：40124733

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