

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592434

研究課題名(和文) 尿路結石に対するミトコンドリア Cyclophilin D の抑制効果と治療への応用

研究課題名(英文) A new treatment agent determining renal calcium crystallization through cyclophilin D activation.

研究代表者

藤田 圭治 (Fujita, Keiji)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：50264734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、尿路結石の初期過程において、腎尿管細胞ミトコンドリアが傷害され、酸化ストレスや細胞傷害を介して結石が形成されることを発見し、その原因としてmitochondrial permeability transition pore (mPTP)の役割について解明した。mPTPの開口の起点となるCyclophilinDを欠損させたマウスにシュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸を連日腹腔内投与したところ、Wild typeマウスと比較して有意に結石形成量が抑制された。さらに、cyclophilinD選択阻害剤を投与することにより、結石モデルマウスにおいて結石を抑制することに成功した。

研究成果の概要(英文)：To experimentally evaluate the clinical application of N-methyl-4-isoleucine cyclosporin, a novel selective inhibitor of cyclophilin D activation. In vitro, calcium oxalate monohydrate crystals induced depolarization of the mitochondrial membrane potential, which was remarkably prevented by N-methyl-4-isoleucine cyclosporin. In vivo, ethylene glycol administration induced renal calcium crystallization, oxidative stress, mitochondrial collapse and cell apoptosis in rats, which were significantly prevented by N-methyl-4-isoleucine cyclosporin.

研究分野：医歯薬学

キーワード：尿路結石 細胞障害 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

尿路結石の生涯罹患率は食文化の欧米化に伴い上昇し、わが国では男性では100人中15人、欧米では20人にも達する国もみられ、その成因の究明と再発予防法の確立は急務である。尿路結石は90%の無機物質と数%の有機物質から構成されている。近年、有機物質の成分としてオステオポンチンなどが同定され、遺伝子レベルで尿路結石の病態研究が進んでいるが、未だ再発予防法は開発されていない。

2. 研究の目的

本研究では、結石形成時の腎尿細管細胞での病態を詳細に解明し、予防法の開発に応用することを目的とし、以下の2つの研究を行う。

(1) Cyclophilin D 欠損マウスを用いた研究(結石形成における cyclophilin D の機能解明): 尿路結石の形成過程における cyclophilin D の役割について cyclophilin D 欠損マウスを用いて検証する。私達はこれまでに結石形成モデルマウスを確立し報告した。この手法を用いた cyclophilin D 欠損マウスと wild type マウスで、酸化ストレスや腎尿細管細胞傷害、尿路結石形成の違いを比較することで、結石形成過程での cyclophilin D さらにはミトコンドリアの機能について解明する。

(2) Cyclophilin D の選択的阻害剤を用いた研究(尿路結石予防薬の開発): Cyclophilin D の選択的阻害剤である NIM811 を結石形成モデル動物に投与し、結石形成を予防できるか検証する。更には、他臓器における薬剤の影響まで検証し、尿路結石形成抑制に向けた予防薬の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) Cyclophilin D 欠損マウスと wild type マウスにグリオキシル酸 100mg/kg を連日6日間腹腔内投与し、尿細管細胞における、Mitochondrial permeability transition pore (MPTP) の開口、酸化ストレス、細胞内 Ca 濃度測定、細胞への結石付着能、結石マトリックス発現の評価を行う。

(2) Cyclophilin D の選択的阻害剤である NIM811 を腎尿細管細胞 (in vitro) と結石形成モデル動物 (in vivo) に投与し、結石形成量、細胞内カルシウム濃度の変化、酸化ストレスや腎尿細管細胞傷害を比較することで、結石を予防できるか検証する。さらに、NIM811 の他臓器への影響を検証する。

4. 研究成果

(1) CyclophilinD を欠損させたマウス

に結石モデルマウス作成の手法に準じてシユウ酸前駆物質であるグリオキシル酸を連日腹腔内投与したところ、Wild type マウスと比較して有意に結石形成量が抑制された。また CyclophilinD の活性には酸化ストレスや細胞質内カルシウム上昇が起点となることが判明した。

(2) cyclophilinD 活性阻害作用を有する cyclosporinA 以外に cyclophilinD 選択的阻害剤 (NIM811 (N-Methyl-4-isoleucine cyclosporine)) を投与することにより、結石モデルマウスにおいて結石を抑制することに成功した。

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 16 件)

1. Hamamoto S, Yasui T, Okada A, Takeuchi M, Taguchi K, Shibamoto Y, Iwase Y, Kawai N, Tozawa K, Kohri K. Developments in the Technique of Endoscopic Combined Intrarenal Surgery in the Prone Split-leg Position. *Urology* 84: 565-570, 2014. doi:10.1016/j.urology.2014.04.020. (査読あり)
2. Taguchi K, Okada A, Kitamura H, Yasui T, Naiki T, Hamamoto S, Ando R, Mizuno K, Kawai N, Tozawa K, Asano K, Tanaka M, Miyoshi I, Kohri K. Colony-stimulating factor-1 signaling suppresses renal crystal formation. *J Am Soc Nephrol* 25:1680-97, 2014. doi:10.1681/ASN.2013060675. (査読あり)
3. Zuo L, Tozawa K, Okada A, Yasui T, Taguchi K, Ito Y, Hirose Y, Fujii Y, Niimi K, Hamamoto S, Ando R, Itoh Y, Zou J, Kohri K. A Paracrine Mechanism Involving Renal Tubular Cells, Adipocytes and Macrophages Promotes Kidney Stone Formation in a Simulated Metabolic Syndrome Environment. *J Urol.* 191:1906-12, 2014. doi:10.1016/j.juro.2014.01.013. (査読あり)
4. Yasui T, Kobayashi T, Okada A, Hamamoto S, Hirose M, Mizuno K, Kubota Y, Umemoto Y, Kawai N, Tozawa K, Gao B, Kohri K. Long-term follow-up of nephrotoxicity in rats administered both melamine and cyanuric acid. *BMC Res Notes.* 8:87, 2014. doi: 10.1186/1756-0500-7-87. (査読あり)
5. Ichikawa J, Okada A, Taguchi K, Fujii Y, Zuo L, Niimi K, Hamamoto S, Kubota Y, Umemoto Y, Itoh Y, Yasui T, Kawai N, Tozawa K, Kohri K. Increased crystal-cell interaction in vitro under co-culture of renal tubular cells and adipocytes by in vitro co-culture

- paracrine systems simulating metabolic syndrome. *Urolithiasis* 42: 17-28, 2014. doi: 10.1007/s00240-013-0612-5. (査読あり)
6. Yasui T, Okada A, Hamamoto S, Taguchi K, Ando R, Mizuno K, Itoh Y, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. Efficacy of retroperitoneal laparoscopic ureterolithotomy for the treatment of large proximal ureteric stones and its impact on renal function. Springerplus doi: 10.1186/2193-1801-2-600, 2013.(査読あり)
 7. Okada A, Yasui T, Taguchi K, Niimi K, Hirose Y, Hamamoto S, Ando R, Kubota Y, Umemoto Y, Tozawa K, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K Impact of official technical training for urologists on the efficacy of shock wave lithotripsy. *Urolithiasis*. 41: 487-492, 2013 doi: 10.1007/s00240-013-0586-3. (査読あり)
 8. Hamamoto S, Yasui T, Okada A, Taguchi K, Kawai N, Ando R, Mizuno K, Kubota Y, Kamiya H, Tozawa K, Kohri K: Endoscopic combined intrarenal surgery for large calculi: Simultaneous use of flexible ureteroscopy and mini-percutaneous nephrolithotomy overcomes the disadvantageous of percutaneous nephrolithotomy monotherapy. *J Endourol*. 28: 28-33, 2014. doi: 10.1089/end.2013.0361. (査読あり)
 9. Yasui T, Okada A, Hamamoto S, Hirose M, Ando R, Kubota Y, Tozawa K, Hayashi Y, Gao B, Suzuki S, Kohri K: The association between the incidence of urolithiasis and nutrition based on Japanese National Health and Nutrition Surveys. *Urolithiasis* 41:217-24.2013. doi: 10.1007/s00240-013-0567-6. (査読あり)
 10. Fujii Y, Okada A, Yasui T, Niimi K, Hamamoto S, Hirose M, Kubota Y, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K: Effect of adiponectin on kidney crystal formation in metabolic syndrome model mice via inhibition of inflammation and apoptosis. *PLoS One*. 2013 Apr 22;8(4):e61343.doi:10.1371/journal.pone.0061343. (査読あり)
 11. Hirose Y, Yasui T, Taguchi K, Fujii Y, Niimi K, Hamamoto S, Okada A, Kubota Y, Kawai N, Itoh Y, Tozawa K, Sasaki S, Kohri K: Oxygen nano-bubble water reduces calcium oxalate deposits and tubular cell injury in ethylene glycol-treated rat kidney. *Urolithiasis*. 41:279-94. 2013. doi: 10.1007/s00240-011-0400-z. (査読あり)
 12. Kohri K, Yasui T, Okada A, Hirose M, Hamamoto S, Fujii Y, Niimi K, Taguchi K: Biomolecular mechanism of urinary stone formation involving osteopontin. *Urol Res*.40:623-37.2012.doi:10.1007/s00240-012-0514-y. (査読あり)
 13. Hirose M, Tozawa K, Okada A, Hamamoto S, Higashibata Y, Gao B, Hayashi Y, Shimizu H, Kubota Y, Yasui T, Kohri K: Role of osteopontin in early phase of renal crystal formation: immunohistochemical and microstructural comparisons with osteopontin knock-out mice. *Urol Res* 40:121-9.2012.doi:10.1007/s00240-011-0400-z. (査読あり)
 14. 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*. 52:1207-17. 2012. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.005. (査読あり)
 15. Hamamoto S, Tozawa K, Nishio H, Kawai N, Kohri K: Successful treatment of primary malignant lymphoma of the penis by organ-preserving rituximab - containing chemotherapy. *Int J Clin Oncol*, 17:181-184, 2012. doi: 10.1007/s10147-011-0273-8. (査読あり)
 16. Takeuchi M, Suzuki T, Sasaki S, Ito M, Hamamoto S, Kawai N, Kohri K, Hara M, Shibamoto: Clinicopathologic significance of high signal intensity on diffusion-weighted MR imaging in the ureter, urethra, prostate and bone of patients with bladder cancer. *Acad Radiol*, 19:827-833, 2012. doi: 10.1016/j.acra.2012.01.013. (査読あり)
- [学会発表](計 2 件)
1. Hamamoto S, Yasui T, Okada A, Okuda N, Koiwa S, Taguchi K, Kamiya H, Hashimoto Y, Iwase Y, Tozawa K, Kohri K: Efficacy of endoscopic combined intrarenal surgery in the prone split-leg position for staghorn calculi. *Expert in stone disease (ESD)*, Capetown, (South Africa). 2014 年、12 月 10 日-13 日
 2. 瀧本周造、安井孝周、小岩哲、伊勢呂哲也、岡田淳志、神谷浩行、橋本良博、藤田圭治、戸澤啓一、岩瀬豊、郡健二郎 「腹臥位」による TUL と PNL の同時治療法の開発～ 3D-CT による腹臥位治療の有用性の検討～ 日本泌尿器科学会総会、札幌プリンスホテル、(北海道札幌市)、2013 年、4 月 25 日-28 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 圭治 (Fujita Keiji)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究
員
研究者番号：50264734

(2) 研究分担者

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：40264733

安井 孝周 (Yasui Takahiro)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
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

濱本 周造 (Hamamoto Shuzo)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究
員
研究者番号：80551267