

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462518

研究課題名(和文) 尿路結石におけるオステオポンチン抗体を用いた分子標的治療の開発

研究課題名(英文) Investigation of the effect of anti-osteopontin antibody on renal crystal formation

## 研究代表者

本間 秀樹 (Homma, hideki)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20260789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、切断型OPNにて露出されるアミノ酸配列(SLAYGLR)に対する中和抗体を作成し、腎結石の形成抑制作用を検討した。抗体投与により、結晶は放射状に形成されるも、内部が細かく砕けていた。電子顕微鏡による尿細管細胞の構造は、WT群では管腔が拡張し、尿細管細胞に取り込まれる結晶を認めたが、抗体投与群においては、尿細管腔内に脱落組織は認めるものの、結晶形成は認めなかった。つまり、OPN抗体で結石形成量や形態形成が抑制されることを証明した。同時にサルモデルでの検討を行ったが、予想に反して腎結石を形成するサルは見つからず、サル腎結石モデル自体がヒトモデルに適さないと判断した。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that the impaired RGD sequence of osteopontin inhibits renal crystal formation by using OPN-transgenic mice and OPN-knockout mice. Here, we investigated the effects of an anti-murine osteopontin antibody (35B6-Ab) that specifically reacts with the 162SLAYGLR168 sequence on renal crystal formation. Scanning electron microscopy showed that the crystals in 35B6-Ab-treated mice were aberrantly formed and their density was low. Microstructure analysis of renal tubular cells by transmission electron microscopy revealed that untreated mice showed collapsed mitochondria in the flattened cytoplasm of renal tubular cells. In vitro, 35B6-Ab was found to inhibit the attachment of 14C-labeled crystals to renal tubular culture cells and reduce morphological damage of these cells.

In conclusion, that 35B6-Ab contributes to the remarkable inhibition of early-stage renal crystal formation by preventing renal tubular cell injury and crystal-cell attachment.

研究分野：尿路結石

キーワード：腎結石 オステオポンチン

### 1. 研究開始当初の背景

日本における尿路結石の発症頻度は、急激に増加し、生涯罹患率は男性では7人に1人、女性では15人に1人となっている。さらに、5年再発率は約50%と報告されている。尿路結石の増加の理由として、食生活や生活様式の欧米化、人口構成の高齢化などが考えられている。現在、尿路結石に対する治療として、体外衝撃波結石破碎術 (ESWL) は効果的であるが、頻回に治療をすることによる腎機能障害など多くの問題が残っている。また尿路結石の90%を占めるシュウ酸カルシウム結石の再発予防治療として厚生省より認可されている治療はほとんどない。これまでの尿路結石の治療は主に、尿中カルシウム (Ca) やシュウ酸などの無機物質からのアプローチが中心であったが、尿路結石の罹患率、再発率が増加の一途をたどっていることを考えると、新たな治療法や予防法の開発が必要である。

### 2. 研究の目的

腎結石形成には結石マトリックス成分の1つであるオステオポンチン (OPN) が強く関わっている。OPN は多くの機能的アミノ酸配列をもち、それらが切断や重合することにより生理活性を生じる。私たちは、結石形成マウスにおいて、非切断型 OPN は腎全体に分布しているが、切断型 OPN は結晶の形成に一致して腎皮髄境界部に発現するという興味の深い現象を見つけた。この現象は、切断型 OPN が腎結石の形成に密接に関わっていることを示すものである。そこで本研究では、切断型 OPN にて露出されるアミノ酸配列 (SLAYGLR) に対する中和抗体を作成し、腎結石の形成抑制作用を検討した。

さらには、よりヒトに近縁の動物として、尿路結石形成を来すサル結石形成モデルの確立を検討した。

### 3. 研究の方法

**35B6 抗体作成** OPN の SLAYGLR 配列を含んだ合成ペプチドで免疫されたマウスからモノクローナル抗体を作成した。*In vitro* 実験 イヌ遠位尿細管上皮 (MDCK) 細胞に放射性同位元素 ( $^{14}\text{C}$ ) でラベルしたシュウ酸カルシウム (COM) 結晶を暴露し、抗体投与による結晶付着能の変化を定量的、形態学的に評価した。*In vivo* 実験 8週齢 C57BL/6 雄マウスの WT 群、抗体投与群、OPN ノックアウトマウス群 (KO 群) (各群 20 匹) を用意し、シュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸 (100mg/kg) を腹腔内連日投与した。抗体投与群には、0、3、6、9日目に 35B6 抗体 (250、500、1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を投与、WT 群、KO 群には、マウス IgG (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を投与し腎組織を採取した。結晶形成の評価は、光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡にて行った。非切断型 OPN、切断型 OPN の発現は、免疫染色、western blotting 法、定量

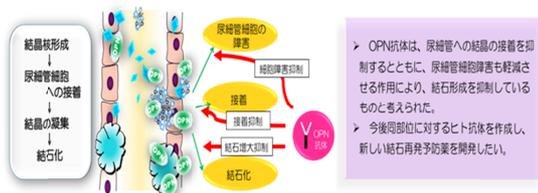
RT-PCR を用い評価した。

### (サル尿路結石モデルの作成)

実験用サルに高脂肪食及び活性型ビタミン D3 を投与することで、Mets と高 Ca 尿症を惹起させ、尿路結石モデルを作る。動物用 CT を用いて結石形成を評価した。

### 4. 研究成果

(*In vitro* 実験) 尿細管細胞に COM 結晶を暴露すると、細胞に結晶が取り込まれ、形態は膨化し崩壊するものの、OPN 抗体投与により、結晶の尿細管細胞への接着、細胞の崩壊が抑制された。( *In vivo* 実験) 結晶形成量は、WT 群で最も多く、抗体投与により容量依存性に低下した。特に 500、1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  抗体投与においては、有意に結晶形成が抑制された。結晶の微細構造は、WT 群では、結晶が整然と放射状に成長し花弁状構造を示しており、KO 群では小さな結晶核が不規則に集まる形態を示した。抗体投与群では、結晶は放射状に形成されるも、内部が細かく砕けていた。透過型電子顕微鏡による尿細管細胞の構造は、WT 群では管腔が拡張し、尿細管細胞に取り込まれる結晶を認めたが、抗体投与群、KO 群においては、尿細管腔内に脱落組織は認められない、結晶形成は認めなかった。つまり、OPN 抗体を結石モデルマウスに投与したところ、結



石形成量や形態形成が抑制されることを証明した。

### (サル尿路結石モデルの作成)

CT スキャンを用いてサルの結石有病率を観察したが、予想に反して腎結石は確認できなかった。サルにおける腎結石モデル形成自体がヒトモデルに適さないと判断した。



### 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 14 件)

1. Taguchi K, Okada A, Hamamoto S, Iwatsuki S, Naiki T, Ando R, Mizuno K, Tozawa K, Kohri K, Yasui T. Proinflammatory and Metabolic Changes Facilitate Renal

- Crystal Deposition in an Obese Mouse Model of Metabolic Syndrome. *J Urol.* 194; 1787-96, 2015. doi: 10.1016/j.juro.2015.07.083. (査読あり)
2. Hamamoto S, Yasui T, Okada A, Koiwa S, Taguchi K, Itoh Y, Kawai N, Hashimoto Y, Tozawa K, Kohri K. Efficacy of Endoscopic Combined Intrarenal Surgery in the Prone Split-Leg Position for Staghorn Calculi. *J Endourol*, 29: 19-24, 2015. doi: 10.1089/end.2014.0372. (査読あり)
  3. 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)
  4. Isero T, Hamamoto S, Koiwa S, Kamiya H, Hashimoto Y, Yasui T, Iwase Y, Kohri K. Combined endoscopic surgery in the prone-split leg position for successful single-session removal of an encrusted ureteral stent: a case report. *J Med Case Rep* 8:128. 2014. doi: 10.1186/1752-1947-8-128. (査読あり)
  5. 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:10.1016/j.juro.2014.01.013. (査読あり)
  6. 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)
  7. 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* doi: 10.1186/1756-0500-7-87. 2014. doi: 10.1186/1756-0500-7-87. (査読あり)
  8. 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)
  9. 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. doi: 10.1186/2193-1801-2-600, 2013.(査読あり)
  10. 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)
  11. 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)
  12. 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)
  13. 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)
  14. 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)

[学会発表](計 16 件)

1. 安井 孝周、田口 和己、瀧本 周造、岡田 淳志、戸澤 啓一、郡 健二郎: 尿路結石の分子機構の解明と溶解療法に向けた研究戦略。第 103 回日本泌尿器科学会総会、2015.4.18-21、石川県立音楽堂 他(石川県金沢市)
2. 田口 和己、海野 怜、瀧本 周造、安藤 亮介、金本 一洋、岡田 淳志、安井 孝周、藤田 圭治、戸澤 啓一、郡 健二郎: シュウ酸カルシウム結石の発生母地「Randall's Plaque」の制御因子同定による尿路結石分子標的治療の開発。第 103 回日本泌尿器科学会総会、2015.4.18-21、石川県立音楽堂 他(石川県金沢市)
3. 伊藤 靖彦、安井 孝周、新美 和寛、海野 怜、田口 和己、安藤 亮介、岡田 淳志、戸澤 啓一、辻本 賀英、郡 健二郎: Cyclophilin D 欠損マウスを用いた尿路結石形成におけるミトコンドリア傷害機序の解明。第 103 回日本泌尿器科学会総会、2015.4.18-21、石川県立音楽堂 他(石川県金沢市)
4. Ito Yasuhiko, Yasui Takahiro, Niimi Kazuhiro, Iwatsuki Shoichiro, Hamakawa Takashi, Taguchi Kazumi, Fujii Yasuhiro, Hirose Yasuhiko, Hamamoto Shuzo, Okada Atsushi, Umemoto Yukihiro, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Mitochondrial collapse depends on Cyclophilin D in renal tubular cells promotes kidney stone formation. American Urological Association Annual Meeting 2015, 2015.5.15-19, New Orleans (USA)
5. Yasui Takahiro, Okada Atsushi, Taguchi Kazumi, Usami Masayuki, Fujii Yasuhiro, Niimi Kazuhiro, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Ando Ryosuke, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Alendronate has a preventive effect for urolithiasis recurrence in men and postmenopausal women with osteoporosis. American Urological Association Annual Meeting 2015, 2015.5.15-19, New Orleans (USA)
6. 新美 和寛、藤井 泰普、伊藤 靖彦、高田 英輝、広瀬 真仁、岡田 淳志、窪田 泰江、安井 孝周、戸澤 啓一、郡 健二郎: ミトコンドリア cyclophilin D をターゲットとした尿路結石に対する新規治療薬と尿中バイオマーカーの開発。第 102 回日本泌尿器科学会総会、2014.4.24-27、神戸国際会議場 他(兵庫県神戸市)
7. 岡田 淳志、田口 和己、藤井 泰普、新美 和寛、瀧本 周造、安井 孝周、広瀬 真仁、戸澤 啓一、郡 健二郎: マルチプレックス解析を用いた尿路結石患者に特異的な尿中マクロファージ関連因子の同定。第 102 回日本泌尿器科学会総会、2014.4.24-27、神戸国際会議場 他(兵庫県神戸市)
8. 田口 和己、岡田 淳志、安井 孝周、廣瀬 泰彦、新美 和寛、瀧本 周造、安藤 亮介、伊藤 恭典、戸澤 啓一、郡 健二郎: 腎結石溶解療法を開発を目指した抗炎症性マクロファージ(M2)による結晶貪食作用の解明。第 102 回日本泌尿器科学会総会、2014.4.24-27、神戸国際会議場 他(兵庫県神戸市)
9. Niimi Kazuhiro, Taguchi Kazumi, Hirose Yasuhiko, Hirose Masahito, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Okada Atsushi, Yasui Takahiro, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Development of a new biomarker and treatment strategy for kidney stone disease targeting mitochondrial cyclophilin D activity. American Urological Association Annual Meeting 2014, 2014.5.16-21, Orlando (USA)
10. Yasui Takahiro, Okada Atsushi, Taguchi Kazumi, Hirose Yasuhiko, Fujii Yasuhiro, Niimi Kazuhiro, Hamamoto Shuzo, Kobayashi Takahiro, Hirose Masahito, Ando Ryosuke, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Bisphosphonate prevents the recurrence of urolithiasis in men with osteoporosis. American Urological Association Annual Meeting 2014, 2014.5.16-21, Orlando (USA)
11. 藤井 泰普、岡田 淳志、海野 怜、伊藤 靖彦、市川 潤、田口 和己、新美 和寛、廣瀬 泰彦、小林 隆宏、宇佐美 雅之、瀧本 周造、廣瀬 真仁、安井 孝周、伊藤 恭典、坂倉 毅、戸澤 啓一、郡 健二郎: 腎尿細管細胞・脂肪細胞・マクロファージの共培養システムを用いたメタボリックシンドローム環境下の結石形成機序の解明。第 24 回日本尿路結石症学会、2014.8.29-30、天王寺都ホテル 他(大阪府大阪市)
12. Yasui Takahiro, Niimi Kazuhiro, Okada Atsushi, Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Tozawa Keiichi, Sasaki Shoichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro, Rodgers Allen: N-methyl-4-isoleucine cyclosporine: An inhibitor of cyclophilin D activation, prevents kidney stone formation by alleviating oxidative stress. SIU 2014, 2014.10.12-15, Glasgow (Scotland)
13. Okada Atsushi, Yasui Takahiro, Zuo Li, Taguchi Kazumi, Fujii Yasuhiro, Itoh Yasunori, Hirose Yasuhiko, Usami Masayuki, Niimi Kazuhiro, Ando Ryosuke, Kobayashi Takahiro, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Itoh Yasuhiko, Tozawa

Keiichi, Kohri Kenjiro: Active phagocytosis and processing of calcium oxalate monohydrate crystals in an in vitro macrophage model. European Association of Urology Annual Meeting 2013, 2013.3.15-19, Milan (Italy)

14. 郡 健二郎: 尿路結石は全身疾患の一症状である; 新しい概念と治療法。第 2 回 TOKYO Urology Conference, 2013.1.16、ホテルメトロポリタンエドモント(東京都千代田区)
15. 新美 和寛、安井 孝周、広瀬 真仁、岡田 淳志、伊藤 靖彦、戸澤 啓一、郡 健二郎: ミトコンドリア cyclophilin D をターゲットとした尿路結石に対する治療薬の開発とバイオマーカーの確立。第 101 回日本泌尿器科学会総会、2013.4.25-28、さっぽろ芸術文化の館 他(北海道札幌市)
16. 安井 孝周、岡田 淳志、宇佐美 雅之、伊藤 恭典、戸澤 啓一、東 義人、佐藤 嘉一、郡 健二郎: ゲノムワイド関連解析による尿路結石の新規遺伝子領域の同定と発症リスク診断法への応用。第 101 回日本泌尿器科学会総会、2013.4.25-28、さっぽろ芸術文化の館 他(北海道札幌市)

〔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

本間 秀樹 (HOMMA Hideki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号: 20260789

### (2) 研究分担者

郡 健二郎 (Kohri Kenjiro)

名古屋市立大学・学長

研究者番号: 30122047

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・助教

研究者番号: 80551267