

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462529

研究課題名(和文) 尿路結石におけるHMGB1とRAGEによる発生機序の解明と阻止機構の証明

研究課題名(英文) The role of HMGB1 and RAGE in urinary stone formation

研究代表者

宮澤 克人 (MIYAZAWA, Katsuhito)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：60219772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：HMGB1およびREGEと尿路結石症発生の関係を明らかとすることを目的として研究を実施して以下の結果を得た。

ヒト腎尿管培養細胞(HK-2細胞)とイヌ腎尿管培養細胞(MDCK細胞)から蛋白抽出を行いWestern blot(一次抗体：abcam ab12029)でHMGB1蛋白発現を認めた。HMGB1ならびに尿路結石のケモカインとしてのMCP-1遺伝子発現の確認を定性PCRで確認した。定量PCRではシュウ酸カルシウム結晶負荷でのMCP-1遺伝子発現のup-regulationを認めたがHMGB1遺伝子発現は分析不可能だった。

研究成果の概要(英文)：We evaluate the relationship between urolithiasis and High Mobility Group Box1 (HMGB1) and Receptor of Advanced of Glycation Endopduct (RAGE).

Renal epithelial HK-2 and MDCK cells were obtained and maintained. Calcium oxalate monohydrate (COM) crystals were suspended in serum-free medium at a final concentration of 500µg/ml. The total protein was extracted by phenol/ammonium acetate in methanol method, and total RNA was extracted by the acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform method. Western blot study revealed the expression of HMGB1. Expression of HMGB1 and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), which is induced by interaction between renal epithelial cells and COM crystals was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). MCP-1 genes were also up-regulated with exposure of COM crystal.

研究分野：尿路結石症

キーワード：urolithiasis calcium oxalate HMGB1 RAGE MCP-1

## 1. 研究開始当初の背景

わが国尿路結石罹患率は全国疫学調査 (Yasui et al. Urology 71: 209-13. 2008) から増加の一途にある。その治療に要する医療費、特に外科的治療費が増加しており医療費抑制の観点からも尿路結石の発生機序解明と発生阻止が必要である。

## 2. 研究の目的

結晶単独では結石化しないことから尿細管細胞・腎間質がその発生に必須と考えられ、尿細管細胞のケモカイン、酸化ストレス、尿中高分子物質などの尿路結石発生に関与する分子の蛋白・遺伝子レベルでの研究が進められているが発生機序の解明には至っていない。

一方、疫学的視点から尿路結石は高血圧、糖尿病、脂質異常症などの合併が高率で生活習慣病の一つとの概念が確立しつつある。

また、尿路結石と動脈硬化の発生機序には類似点があるとの報告 (Yasui et al. Scand J Urol Nephrol 41: 419-21. 2007) やインスリン抵抗性とも関係を示唆する報告がある。(Iba et al. BJU Int 106: 1550-4. 2010)

さらに、生体内外からの侵襲に際し生成され免疫応答などを促進する分子の alamin の一つである High Mobility Group Box1 (HMGB1) が動脈硬化の発生に関与するとの報告がある。(Inoue et al. Cardiovasc Pathol 16: 136-143. 2007) 加えて、我々は MAPK38, NF- B, AP-1 など尿路結石発生に関する重要な因子 (Khan. Urol Res. 33: 359-357. 2005) のシグナル伝達を司っている HMGB1 遺伝子発現変化を尿酸カルシウム結晶負荷に

よる腎尿細管細胞のマイクロアレー解析で報告している。(Miyazawa et al. Urol Res. 37: 27-33. 2009)

HMGB1 のレセプターである Receptor of Advanced of Glycation Endproduct (REGE) は血管障害やインスリン抵抗性(Unoki et al. Curr Pharm Des 14: 987-989. 2008)、慢性腎臓病(Ueda et al. Nephrology 12 582-590. 2007)にかかわることが報告されている。

本研究では尿路結石を全身疾患として捉え、動脈硬化や糖尿病において関連がある HMGB1 とそのレセプター RAGE の尿路結石発生における役割を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒト腎尿細管培養細胞(HK-2 細胞)とイヌ腎尿細管培養細胞(MDCK 細胞)を用いた。Dulbecco's modified Eagle's medium (5% fetal calf serum と 1% non-essential amino acids および抗生剤を添加)で継代培養して本研究課題に最適とされる passage 5~6 の状態に調整した。液体窒素による保存と融解後の培養によって細胞形態と生物学活性に変化が発生しないことを顕微鏡下の観察と MTT assay で検証した。また、結晶と血清蛋白による反応を最小限とするため serum free の培養液で 24 時間培養を行った。そしてこの操作によっても細胞形態と生物学活性に変化が発生しないことを同様の方法で検証した。

これらの細胞および尿酸カルシウム(CaOx)結晶(5-10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )を負荷した細胞から Total RNA を抽出後、バイオアナライザー(Agilent 2100)にて RNA の quality と quantity を統一し On demand primers & probe を使用し PRISM7700 による real time RT-PCR で HMGB1 と RAGE および尿路結石のケモカインとして MCP-1 遺伝子発現を定量した。また、

phenol/ammonium acetate in methanol 法でタンパク抽出を行い SDS-PAGE、Western blot (一次抗体: abcam ab12029) でタンパク発現を定量した。

#### 4. 研究成果

液体窒素による保存と融解後の培養によって細胞形態と生物学活性に変化が発生しないことを顕微鏡下の観察と MTT assay で証明した。

蛋白解析では Western blot (一次抗体: abcam ab12029) で HMBG1 蛋白発現を認めた。

遺伝子解析では HMBG1 ならびに尿路結石のケモカインとしての MCP-1 遺伝子発現を定性 PCR で確認した。定量 PCR では CaOx 結晶負荷での MCP-1 遺伝子発現の up-regulation を認めしたが HMBG1 遺伝子発現は分析不可能だった。

#### 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 2 件)

宮澤克人、井上慎也、中澤佑介、中井 暖、森田展代、鈴木孝治； 尿路結石研究から学んだ分子生物学，日本尿路結石症学会誌，14(2)：34-40，2015. 査読なし

宮澤克人，井上慎也，中澤佑介； 尿路結石のクリニカル・パール，臨泌，68:874-877，2014. 査読あり

[学会発表](計 7 件)

Nobuyo Morita，Shinya Inoue，Yusuke Nakazawa，Dan Nakai，Katsuhito Miyazawa. Microplate method for measurement of urinary supersaturation to indicate stone recurrence of calcium oxalate. 13th International Symposium on Urolithiasis 2016.7.22. 幕張メッセ(千葉県千葉市)

Dan Nakai，Shinya Inoue，Yusuke Nakazawa，Nobuyo Morita，Katsuhito Miyazawa. Febuxostat reduces calcium oxalate monohydrate crystal-induced upregulation of MCP-1 in MDCK cells 13th International Symposium on Urolithiasis 2016.7.22. 幕張メッセ(千葉県千葉市)

中井 暖、井上慎也、中澤佑介、森田展代、宮澤克人、石垣靖人. Febuxostat はシュウ酸カルシウム結晶による MCP-1 アップレギュレーションを抑制する. 第 20 回北陸泌尿器科 Basic Research Meeting 2016.3.5. 都ホテル(石川県金沢市)

宮澤克人，井上慎也，中澤佑介，中井 暖，森田展代，鈴木孝治. 尿路結石症研究から学んだ分子生物学. 日本尿路結石症学会第 25 回学術集会 2015.8.28. ロワジールホテル(北海道旭川市)

Katsuhito Miyazawa，Nobuyo Morita Shinya Inoue，Yusuke Nakazawa，Dan Nakai. Role of protease-activated receptors for calcium oxalate stone formation in tubular epithelial cells. USANZ2015 68th Annual Scientific Meeting 2015.4.12. Adelaide convention center (Australia, Adelaide)

Katsuhito Miyazawa. Stone controversy: Lower pole stones and proximal ureteral stones. Advancements in Urology 2015-an AUA/JUA Symposium 2015.2.14. Sheraton hotel (米国 Honolulu)

中井 暖，井上慎也，中澤佑介，森田展代，宮澤克人. 第 18 回北陸泌尿器科 Basic Research Meeting: 尿路結石形成に対する Cyclooxygenase 2 の役割について. 2014. 3.5. 都ホテル(石川県金沢市)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

宮澤 克人 (MIYAZAWA, Katsuhito)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：60219772

### (2)研究分担者

森田 展代 (MORITA, Nobuyo)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：20440505