

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861437

研究課題名(和文)ミトコンドリア傷害を標的とした尿路結石の新規治療薬とバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Investigation of the effect of the inhibitor of mitochondrial cyclophilin D activation on renal calcium crystallization.

研究代表者

新美 和寛 (Niimi, Kazuhiro)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：70551274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：【目的】私たちは、シクロスポリンがミトコンドリアcyclophilin D(Cyp D)の活性を阻害することで、ミトコンドリア傷害を予防し結石形成を抑制することを報告した。本研究では、Cyp Dの活性を阻害する薬剤としてNIM811を開発するとともに、Cyp Dの治療バイオマーカーとしての可能性を検討した。【結果】研究1：NIM投与群では結石形成がcontrol群に比べ有意に低下した。研究2：尿中Cyp Dはcontrol群に比べて結石形成群で有意に増加し、NIM投与群では減少した。【結論】NIM811は結石抑制効果を示した。また尿中Cyp Dは治療バイオマーカーとなり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We experimentally evaluated 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. Herein we first report a new treatment agent determining renal calcium crystallization through cyclophilin D activation.

研究分野：尿路結石

キーワード：尿路結石 ミトコンドリア シクロスポリン NIM811

### 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) 尿路結石予防薬の開発(ミトコンドリア Cyclophilin D 活性化の抑制)

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し、尿路結石形成抑制に向けた予防薬の開発を行う。

#### (2) 尿路結石治療バイオマーカーの確立(尿中 Cyclophilin D の検出)

結石形成モデル動物の尿中 Cyclophilin D の検出を試みる。尿中の蛋白をアセトン吸着法により抽出して Western blotting 法で検出の可否を判断し、ELISA 法で定量化する。さらに、ヒトの尿から Cyclophilin D の検出を行い、結石患者と健常者、結石患者でも結石が出来ている時と出来ていないときを比較し、治療バイオマーカーとしての有用性を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 尿路結石予防薬の開発(ミトコンドリア Cyclophilin D 活性化の抑制)

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、ミトコンドリアの形態、細胞内カルシウム濃度、シュウ酸カルシウム結晶の付着能、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。

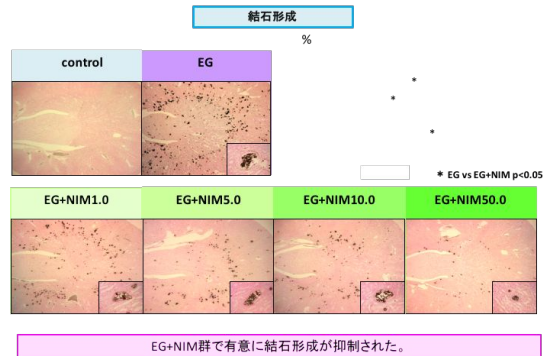
#### (2) 尿路結石治療バイオマーカーの確立(尿中 Cyclophilin D の検出)

ヒトおよび結石形成モデル動物の尿中 Cyclophilin D の検出を試みる。尿中の蛋白をアセトン吸着法により抽出して Western

blotting 法で検出の可否を判断し、ELISA 法で定量化する。

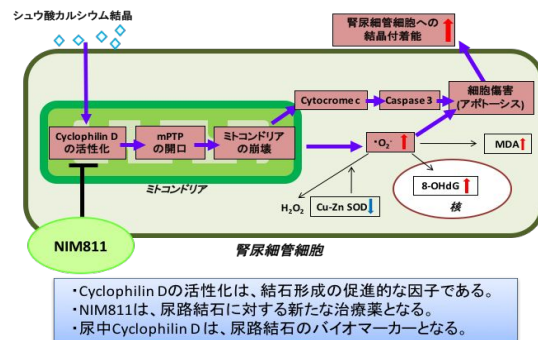
### 4. 研究成果

(1) 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。



(2) 結石形成モデル動物では、腎尿細管細胞から傷害されたミトコンドリアが尿中に脱落することにより、尿中 Cyclophilin D が増加した。一方、EG+NIM 群では有意に抑制された。

#### 本研究から判ったこと



- ・Cyclophilin D の活性化は、結石形成の促進的な因子である。
- ・NIM811は、尿路結石に対する新たな治療薬となる。
- ・尿中Cyclophilin Dは、尿路結石のバイオマーカーとなる。

### 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 6 件)

1. Niimi K, Yasui T, Okada A, Hirose Y, Kubota Y, Umemoto Y, Kawai N, Tozawa K, Kohri K. Novel effect of the inhibitor of mitochondrial cyclophilin D activation, N-methyl-4-isoleucine cyclosporin, on renal calcium crystallization. *Int J Urol.* 21: 707-13. 2014. doi; 10.1111/iju.12425. (査読あり)
2. 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)
3. 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)
  4. 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)
  5. 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)
  6. 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 12 件)

1. 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)

2. Yasui Takahiro, Okada Atsushi, Taguchi Kazumi, Usami Masayuki, Fujii Yasuhiro, Niimi Kazuhiro, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Ando Ryosuke, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Hayashi Yutarō, 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)
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. Yasui Takahiro, Niimi Kazuhiro, Okada Atsushi, Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Tozawa Keiichi, Sasaki Shoichi, Hayashi Yutarō, 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)
5. 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、濱本 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)
6. 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)
7. 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)
  8. 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)
  9. 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)
  10. 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: 腎結石溶解療法の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)
  11. 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)
  12. Okada Atsushi, Yasui Takahiro, Zuo Li, Taguchi Kazumi, Fujii Yasuhiro, Itoh Yasunori, Hirose Yasuhiko, Uasami 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)

〔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

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

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし