

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10628

研究課題名(和文)腎結石形成における切断型オステオポンチンの機能解析とその抗体を用いた治療法の開発

研究課題名(英文)The role of the cleaved osteopontin in stone formation

研究代表者

濱本 周造 (Hamamoto, Shuzo)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：80551267

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)：今までの研究により、OPNには結石形跡に係る重要なアミノ酸配列があることがわかった。その一つに細胞接着に係るRGD配列であった。今回、RGD配列に隣接するトロンビン切断部位に対する特異的抗体を作成し、結石モデルマウスに投与したところ、結石形成の初期過程である陣尿管の細胞障害や結石の接着を抑えることで、結石の成長が抑制されることを証明した。サルに対する抗OPN抗体を作成し、サルにおける結石形成抑制作用について検討しようとしたが、サル自身がシュウ酸カルシウム結石を罹患しなかったため、結石モデル動物として適さないと判断した。

研究成果の概要(英文)：Osteopontin (OPN) plays a crucial role in the formation of renal calcium crystals, which are primarily induced by renal tubular cell injury. We have previously shown that the impaired RGD sequence, which serves as an adhesion motif that promotes cell attachment, inhibits renal crystal formation by using OPN-transgenic mice and OPN-knockout mice. In this study, thrombin-cleaved osteopontin plays a nonredundant role in renal crystal formation, which is a complex multistep process. A specific anti-OPN antibody contributes to the remarkable inhibition of early stage of renal crystal formation by suppressing RTC injury, the attachment of crystals to renal epithelium cells or crystal growth.

研究分野：泌尿器科

キーワード：尿路結石 オステオポンチン 細胞障害

1. 研究開始当初の背景

日本における腎結石の発症頻度は、この40年間で約3倍に増加し、5年再発率は約50%と報告されている。現在、腎結石に対する治療として、体外衝撃波結石破碎術は効果的であるが、頻回に治療することによる腎機能障害や再発リスクなどの問題が残っている。また、腎結石の90%を占めるシュウ酸カルシウム結石の再発予防法は、飲水指導と食事指導のみで有効な薬剤はない。これまで、腎結石の予防法は、尿中カルシウムやシュウ酸などの無機物質の見地から開発が試みられてきたが、有効な成果が得られていない。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、これまでとは全く異なったアプローチが必要である。

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を確立か検討した。

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(¹⁴C)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

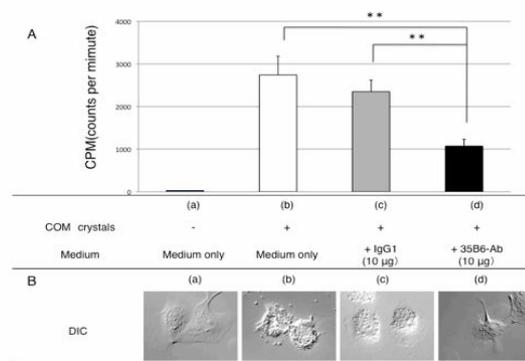
マウスのWT群、抗体投与群、OPNノックアウトマウス群(KO群)(各群20匹)を用意し、シュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸(100mg/kg)を腹腔内連日投与した。抗体投与群には、0、3、6、9日目に35B6抗体(250、500、1000µg/ml)を投与、WT群、KO群には、マウスIgG(500µg/ml)を投与し腎組織を採取した。結晶形成の評価は、光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡にて行った。非切断型OPN、切断型OPNの発現は、免疫染色、western blotting法、定量RT-PCRを用い評価した。

(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。

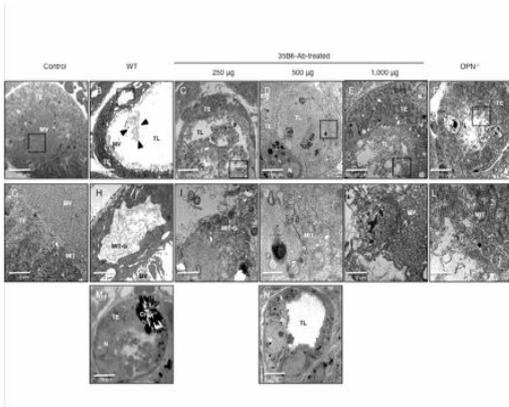
4. 研究成果

(*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。



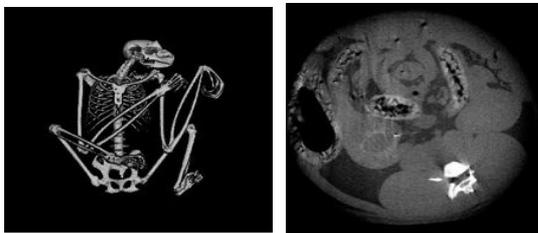
(*In vivo*実験)結晶形成量は、WT群で最も多く、抗体投与により容量依存性に低下した。特に500、1000µg/ml抗体投与においては、有意に結晶形成が抑制された。結晶の微細構造は、WT群では、結晶が整然と放射状に成長し花弁状構造を示しており、KO群では小さな結晶核が不規則に集まる形態を示した。抗体投与群では、結晶は放射状に形成されるも、内部が細かく砕けていた。透過型電子顕微鏡

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ましたが、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るものの、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かくにんできなかった。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 7 件)

- 1- Usami M, Okada A, Taguchi K, Hamamoto S, Kohri K, Yasui T. Genetic differences in C57BL/6 mouse substrains affect kidney crystal deposition. *Urolithiasis*. 2018 Jan 23. doi: 10.1007/s00240-018-1040-3. [Epub ahead of print]
- 2- Inoue Takaaki, Okada Shinsuke, Hamamoto Shuzo, Yoshida Takashi, Matsuda Tadashi : Current trends and pitfalls in endoscopic treatment of urolithiasis. *Urology*, 25(2):121-133, 2018
- 3- Okada Atsushi, Hamamoto Shuzo, Taguchi Kazumi, Unno Rei, Sugino Teruaki, Ando Ryosuke, Mizuno Kentaro, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Kidney stone formers have more renal parenchymal crystals than non-stone formers, particularly in the papilla region, *BMC Urology*, 18:19, 2018
- 4- Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Okada Atsushi, Unno Rei, Kamisawa Hideyuki, Naiki Taku, Ando Ryosuke, Mizuno Kentaro, Kawai Noriyasu, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Genome-wide gene expression profiling of randall's plaques in calcium oxalate stone formers. *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(1): 333-347, 2017 (doi: 10.1681/ASN.2015111271)
- 5- Yasui T, Okada A, Hamamoto S, Ando R, Taguchi K, Tozawa K, Kohri K. Pathophysiology-based treatment of urolithiasis. *Int J Urol*. 2017 Jan;24(1):32-38.
- 6- Unno Rei, Taguchi Kazumi, Okada Atsushi, Ando Ryosuke, Hamamoto Shuzo, Kubota Yasue, Zuo Li, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Potassium-sodium citrate prevents the development of renal microcalculi into symptomatic stones in calcium stone-forming patients. *International Journal of Urology*, 2017 (doi: 10.1111/iju.13242) Taguchi K, Okada A,
- 7- 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. 2015
Dec;194(6):1787-96.

〔学会発表〕(計 16 件)

Hamamoto Shuzo, Sugino Teruaki, Unno Rei, Taguchi Kazumi, Ando Ryosuke, Okada Shinsuke, Inoue Takaaki, Okada Atsushi, Tozawa Keiichi, Yasui Takahiro: A new navigation system of renal puncture for endoscopic combined intrarenal surgery: real-time virtual sonography-guided renal access. American Urological Association Annual Meeting 2017, 2017 年

瀧本 周造、岡田 真介、井上 貴昭、杉野 輝明、海野 奈央子、海野 怜、山田 健司、安藤 亮介、岡田 淳志、三浦 浩康、松田 公志、安井 孝周: 尿管所見から考える嵌頓結石に対する理想的な治療介入時期の検討。第 105 回日本泌尿器科学会総会、2017 年

宇佐美 雅之、海野 怜、田口 和己、廣瀬 泰彦、瀧本 周造、安藤 亮介、岡田 淳志、伊藤 恭典、戸澤 啓一、郡 健二、安井 孝周: ルイボス茶による抗酸化作用および尿路結石に与える影響。第 105 回日本泌尿器科学会総会、2017 年

藤井 泰普、田口 和己、岡田 淳志、杉野 輝明、海野 怜、宇佐美 雅之、瀧本 周造、安藤 亮介、神谷 浩行、伊藤 恭典、戸澤 啓一、郡 健二、安井 孝周: メタボリックシンドロームにおける腎結石とマクロファージとの関連性の検討。第 66 回日本泌尿器科学会中部総会、2016 年

Itoh Yasunori, Taguchi Kazumi, Fujii Yasuhiro, Hirose Yasuhiko, Usami Masayuki, Hamamoto Shuzo, Kobayashi Takahiro, Hirose Masahito, Okada Atsushi, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Silodosin, the selective alpha 1A adrenoceptor antagonist, facilitates expulsion of size 5-10 mm distal ureteral. 13th International Symposium on Urolithiasis, 2016 年

Fujii Yasuhiro, Okada Atsushi, Taguchi Kazumi, Ito Yasuhiko, Usami Masayuki, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Itoh Yasunori, Sakakura Takeshi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Effects of atherosclerosis-related factors on renal crystal formation in a mouse model of metabolic syndrome. 13th

International Symposium on
Urolithiasis, 2016 年

Okada Atsushi, Unno Rei, Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Zuo Li, Gao Bing, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Efficacy of ESWL training using human body-typed stone-targeting phantoms. 13th International Symposium on Urolithiasis, 2016 年

Usami Masayuki, Fujii Yasuhiro, Hirose Yasuhiko, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Okada Atsushi, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Gao Bing, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Nnt gene suppresses kidney stone formation and oxidative stress. 13th International Symposium on Urolithiasis, 2016 年

海野 怜、田口 和己、瀧本 周造、杉野 輝明、安藤 亮介、岡田 淳志、伊藤 恭典、戸澤 啓一、郡 健二、安井 孝周: 腎結石形成におけるオートファジーの関与と機能解析。日本尿路結石症学会第 26 回学術集会。2016 年

Taguchi Kazumi, Okada Atsushi, Unno Rei, Fujii Yasuhiro, Hirose Yasuhiko, Usami Masayuki, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Different roles of M1/M2 macrophage phenotype for renal crystal formation. 2016 (111th) Annual Meeting of American Urological Association (San Diego, USA) 2016 年

Okada Atsushi, Taguchi Kazumi, Fujii Yasuhiro, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Sasaki Shoichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Identification of urinary macrophage-related factors specific to patients with calcium oxalate stones using multiplex analysis. 2016 (111th) Annual Meeting of American Urological Association (San Diego, USA) 2016 年

Itoh Yasunori, Okada Atsushi, Taguchi Kazumi, Hirose Yasuhiko, Fujii Yasuhiro, Kobayashi Takahiro, Usami Masayuki, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Tozawa Keiichi, Sasaki Shoichi, Yasui Takahiro, Kohri Kenjiro: Administration of the selective alpha 1A adrenoceptor

antagonist silodosin facilitates expulsion of size 5 - 10 mm distal ureteral stones, as compared to control. 2016 (111th) Annual Meeting of American Urological Association. 2016 年

Taguchi Kazumi, Okada Atsushi, Hamamoto Shuzo, Unno Rei, Kamisawa Hideyuki, Naiki Taku, Ando Ryosuke, Umemoto Yukihiro, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: The role of M1/M2 macrophages for CaOx stone and Randall's plaque formation. The 31th Annual Congress of the European Association of Urology, 2016 年

Yasunori Itoh, Atsushi Okada, Kazumi Taguchi, Yasuhiko Hirose, Yasuhiro Fujii, Takahiro Kobayashi, Masayuki Usami, Shuzo Hamamoto, Masahito Hirose, Takahiro Yasui, Keiichi Tozawa, Shoichi Sasaki, Yutaro Hayashi, Kenjiro Kohri: Administration of the selective alpha 1A adrenoceptor antagonist silodosin facilitates expulsion of size 5 - 10 mm distal ureteral stones, as compared to control. 2015 (110th) Annual Meeting of American Urological Association (New Orleans, Louisiana, USA) 2015 年

岡田淳志、海野怜、田口和己、遠藤純央、小林隆宏、廣瀬泰彦、藤井泰普、宇佐美雅之、浜本周造、安藤亮介、矢内良昌、伊藤恭典、戸澤啓一、安井孝周、郡健二郎：マルチプレックス解析を用いたシュウ酸カルシウム患者に特異的な尿中マクロファージ関連因子の同定。日本尿路結石症学会第 25 回学術集会(旭川市)2015 年

Kazumi Taguchi, Rei Unno, Yasuhiro Hirose, Shuzo Hamamoto, Takahiro Kobayashi, Ryosuke Ando, Atsushi Okada, Yasunori Itoh, Takahiro Yasui, Keiichi Tozawa, Yutaro Hayashi, Kenjiro Kohri: PPAR- / agonists have different effects on renal crystal formation in hyperoxaluric animal models. 2015 (110th) Annual Meeting of American Urological Association (New Orleans, Louisiana, USA) 2015 年

〔図書〕(計 2 件)

- 1- 安井孝周、岡田淳志、濱本周造、田口和己、海野怜、杉野輝明：特集 メタボリック症候群と腎泌尿器疾患 疾患予防への挑戦 分子生物学的機序からみたメ

タボリックシンドロームと尿路結石予防。腎臓内科・泌尿器科、5(2):156-163、2017

- 2- 岡田淳志、田口和己、安井孝周：TOPICS 泌尿器科学 腎結石の原基 Randall's plaque の発生と関連遺伝子発現。医学のあゆみ、263(8):669-671、2017

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱本周造 (Hamamoto Shuzo)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：80551267

(2) 研究分担者

郡健二郎 (Kohri Kenjiro)

名古屋市立大学・その他・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・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・准教授
研究者番号：70444956