

令和元年5月27日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11053

研究課題名（和文）オステオポンチンの切断・重合に着目した尿路結石形成バイオマーカーの確立

研究課題名（英文）Development of the biomaker of kidney stone formation

研究代表者

本間 秀樹（HONMA, 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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、初めにOPNタンパクのRGD配列の隣にあって、切断型OPNにて露出されるアミノ酸配列に対する中和抗体を作成し、腎結石形成作用を検討した。抗体投与により、マウスの腎結晶は通常のマウス腎結石と比較して、内部が細かく、小さな結晶となることがわかった。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、切断型OPNは結石形成を促進させる可能性があることがわかった。この結果をもとに、腎結石患者・健常人の尿中の重合OPNを測定したところ、腎結石患者において、OPN濃度が高値となることがわかった。つまり、切断型OPNや重合OPNが腎結石形成におけるバイオマーカーとなることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

切断型OPNや重合OPNなど、OPN構造変化が尿路結石形成と密接に関係していることがわかった。切断型OPNに対する抗体は、腎結石に対する分子標的治療となる可能性があり、尿中における重合OPNは、腎結石形成のバイオマーカーとなる可能性がわかった。今後増え続ける腎結石の中で、新しい結石治療薬の開発が求められる。治療薬の効果判定には、結石形成のバイオマーカーが必要となるため、本研究結果は、新しい治療薬開発の礎になると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Osteopontin plays a crucial role in the formation of renal calcium crystals, which are primarily induced by renal tubular cell injury, especially mitochondrial damage. In this study, we analyze the effect of the cryptic OPN epitope generated by thrombin cleavage and by polymerization on renal crystal formation. We found that a specific anti-OPN antibody contributes to the remarkable inhibition of early stage of renal crystal formation and that thrombin-cleaved OPN contributes to promote the renal crystal formation. As regard to OPN polymerization, the amount of polymerized OPN in the urine of stone formers were higher than that of the healthy human. We speculated that polymerized OPN could be the marker of kidney stone formation.

研究分野：尿路結石

キーワード：尿路結石 オステオポンチン バイオマーカー

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、体外衝撃波結石破砕術(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。

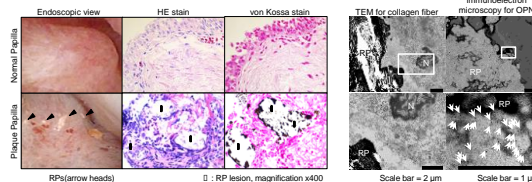
2. 研究の目的

私たちは、無機物質からのこれまでの治療に限界を感じ、有機物質としてオステオポンチン(OPN)を同定し、その分子機構を世界に先駆けて解明した。そこで、OPN遺伝子組み換えマウスを作成し、OPNは尿路結石の形成を促進することを証明した。今後、ヒトへの臨床応用に向けた研究が必須と考えるが、結石治療の効果判定のためのバイオマーカーがないことが、新しい創薬開発にむけての大きな課題である。OPNは、酵素による切断や重合による翻訳後修飾を受けて活性を変化させる。本研究では、これら一連の研究結果を踏まえ、切断・重合型OPNの作用を解明し、**尿路結石形成の新しいバイオマーカーの確立**を目指す。

3. 研究の方法

(結石モデルマウスに対する切断型OPN抗体の効果)

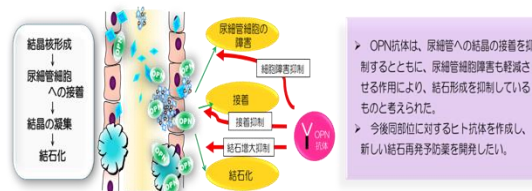
8週齢C57BL/6雄マウスのWT群、抗体投与群、OPNノックアウトマウス群(KO群)(各群20匹)を用意し、シュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸(100mg/kg)を腹腔内連日投与した。抗体投与群には、0、3、6、9日目に35B6抗体(250、500、1000 μ g/ml)を投与、WT群、KO群には、マウスIgG(500 μ g/ml)を投与し腎組織を採取した。結晶形成の評価は、光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡にて行った。非切断型OPN、切断型OPNの発現は、免疫染色、western blotting法、定量RT-PCRを用い評価した。



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。

(ヒト腎生検組織を用いた尿路結石形成に関わる責任遺伝子の網羅的解析)

名古屋市立大学大学院医学研究科倫理審査委員会での承認のもと、上部尿路結石にて内視鏡的碎石術を施行する患者と、精査目的で尿管鏡を行う非結石患者を対象とし、結石患者の腎乳頭部のRandall's plaque部位と正常腎盂の粘膜組織、非結石患者の正常腎盂粘膜組織を生検し、尿路結石形成にかかわる責任遺伝子の網羅的解析を行なった。



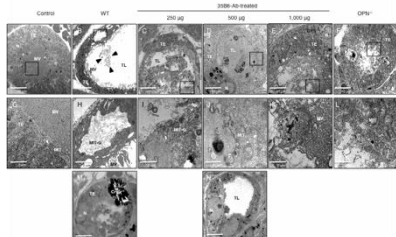
(ヒトにおける結石形成バイオマーカーの探索)

重合OPNの特異的epitopeを作成し、結石患者/健康人の尿中OPN濃度を測定・比較した。

4. 研究成果

(結石モデルマウスに対する切断型OPN抗体の効果)

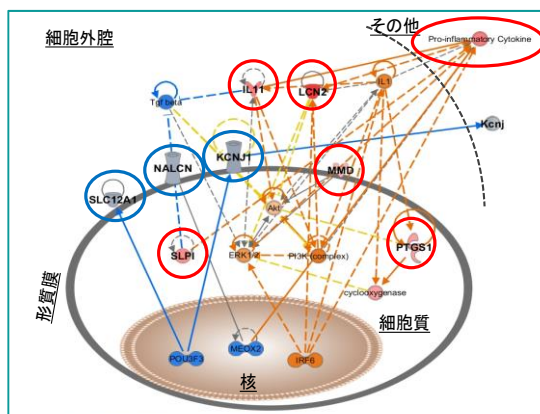
結晶形成量は、WT群で最も多く、抗体投与により容量依存性に低下した。特に500、1000 μ g/ml抗体投与においては、有意に結晶形成が抑制された。結晶の微細構造は、WT群では、結晶が整然と放射状に成長し花弁状構造を示しており、KO群では小さな結晶核が不規則に集まる形態を示した。抗体投与群では、結晶は放射状に形成されるも、内部が細かく砕けていた。透過型電子顕微鏡による尿細管細胞の構造は、WT群では管腔が拡張し、尿細管細胞に取り込まれる結晶を認めたが、抗体投与群、KO群においては、尿細管腔内に脱落組織は認めるものの、結晶形成は認めなかった。つまり、OPN抗体を結石モデルマウスに投与したところ、結石形成量や形態形成が抑制されること、切断型OPNは結石形成を促進させる可能性があることを証明した。



(ヒト腎生検組織を用いた尿路結石形成に関わる責任遺伝子の網羅的解析)

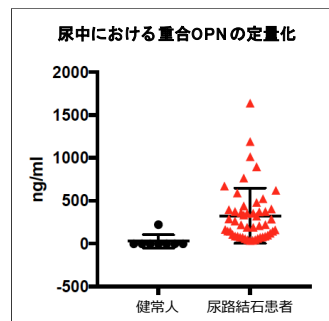
Randall's plaqueを電子顕微鏡で観察したところ、RPはリン酸カルシウムで構成され、内

部にオステオポンチンと周囲にコラーゲンの発現を伴っていることがわかった。さらに、DNA マイクロアレイの結果から、Randall's Plaque 周囲では炎症/腎障害・免疫細胞・酸化ストレス・血管収縮に関わる遺伝子の発現が増加し、ナトリウム・カリウム・クロールなどの輸送に関わる遺伝子の発現が低下しており、これらのネットワークにおいて炎症促進サイトカインによる細胞障害が Randall's Plaque の発生に関わることが明らかにされた。



(ヒトにおける結石形成バイオマーカーの探索)

重合 OPN を測定する ELISA キットを作成し、尿中 OPN 濃度を測定したところ、腎結石患者では、健常人と比べて、重合 OPN 濃度が上昇していることがわかった。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

1-Okada Atsushi, Ando Ryosuke, [Taguchi Kazumi](#), [Hamamoto Shuzo](#), Unno Rei, Sugino Teruaki, Tanaka Yutaro, Mizuno Kentaro, [Tozawa Keiichi](#), [Kohri Kenjiro](#), [Yasui Takahiro](#):

Identification of new urinary risk markers for urinary stones using a logistic model and multinomial logit model. *Clinical and Experimental Nephrology* 23(5):710-716 2019 (査読あり)

2- Usami Masayuki, [Okada Atsushi](#), [Hamamoto Shuzo](#), Kohri Kenjiro, [Yasui Takahiro](#): Genetic differences in C57BL/6 mouse substrains affect kidney crystal deposition. *Urolithiasis*, 46(6):515-522, 2018 (doi: 10.1007/s00240-018-1040-3.) (査読あり)

3- 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 (査読あり)

4- [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 (査読あり)

5-[Taguchi Kazumi](#), Usawachintachit Manint, Tzou T David, Sherer A Benjamin, Metzler Ian, Issacson Dylan, Stoller L Marshall, Chi Thomas: Micro-costing analysis demonstrates comparable costs for LithoVue™ compared to reusable flexible fiberoptic ureteroscopes. *Journal of Endourology*, 32(4):267-273, 2018(doi: 10.1089/end.2017.0523) (査読あり)

6-Inoue Takaaki, Okada Shinsuke, [Hamamoto Shuzo](#), Yoshida Takashi, Murota Takashi, Matsuda Tadashi: Impact of ureteric stent removal by string on patient's quality of life and on complications at post-ureteroscopy for urolithiasis: a controlled trial. *BJU International*, 2018(doi: 10.1111/bju.14622) (査読あり)

7- [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) (査読あり)

8- [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. (査読あり)

9- 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) (査読あり)

10-Sugino Teruaki, [Hamamoto Shuzo](#), Unno Rei, Moritoki Yoshinobu, Hamakawa Takashi, Naiki Taku, Ando Ryosuke, [Okada Atsushi](#), [Yasui Takahiro](#): Two-year-old girl with impacted ureteral stone successfully treated with a single session of combined percutaneous nephrostomy and ureteroscopy. *International Journal of Urology*, 24(4):326-329, 2017(doi: 10.1111/iju.13319.) (査読あり)

11-[Taguchi Kazumi](#), Usawachintachit Manint, [Hamamoto Shuzo](#), Unno Rei, Tzou T. David, Sherer

A. Benjamin, Wang Yongmei, Okada Atsushi, Stoller L. Marshall, Yasui Takahiro, Chi Thomas: Optimizing RNA extraction of renal papilla biopsy tissue in kidney stone formers: a new methodology for genomic study. Journal of Endourology, 31(9):922-929, 2017(doi: 10.1089/end.2017.0320.) (査読あり)

〔学会発表〕(計 24 件)

- ①岡田 淳志、田口 和己、田中 勇太郎、杉野 輝明、海野 怜、宇佐美 雅之、新美 和寛、藤井 泰普、廣瀬 泰彦、瀧本 周造、広瀬 真仁、戸澤 啓一、郡 健二郎、安井 孝周：尿路結石モデルマウスに始まる私たちがたどった基礎研究の道。日本尿路結石学会第 28 回学術集会、2018. 8. 24-25、大阪市
- ②岡田 淳志、田口 和己、田中 勇太郎、杉野 輝明、海野 怜、宇佐美 雅之、新美 和寛、藤井 泰普、廣瀬 泰彦、瀧本 周造、広瀬 真仁、戸澤 啓一、郡 健二郎、安井 孝周：尿路結石モデルマウスに始まる私たちがたどった基礎研究の道。日本尿路結石学会第 28 回学術集会、2018. 8. 24-25、大阪市
- ③Hamamoto Shuzo, Unno Rei, Taguchi Kazumi, Ando Ryosuke, Okada Shinsuke, Inoue Takaaki, Okada Atsushi, Tozawa Keiichi, Miura Hiroyasu, Matsuda Tadashi, Yasui Takahiro: Establishment of treatment strategies for impacted calculi by analyzing the ureteroscopic findings. American Urological Association Annual Meeting 2018, 2018. 5. 18-21, San Francisco, USA
- ④Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Unno Rei, Tanaka Yutaro, Sugino Teruaki, Ando Ryosuke, Okada Atsushi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Pro-inflammatory and immune-active responses predominantly leading to Randalls plaque formation on calcium phosphate stone. American Urological Association Annual Meeting 2018, 2018. 5. 18-21, San Francisco, USA
- ⑤Okada Atsushi, Takase Hiroshi, Sugino Teruaki, Unno Rei, Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Tozawa Keiichi, Yasui Takahiro: Establishment of a new method to evaluate the phagocytic ability of calcium oxalate monohydrate crystals by macrophages. American Urological Association Annual Meeting 2018, 2018. 5. 18-21, San Francisco, USA
- ⑥瀧本 周造：進化を続ける PNL/ECIRS～軌跡をたどり、今後の可能性を考える～。第 106 回日本泌尿器科学会総会、2018. 4. 19-22、京都市
- ⑦瀧本 周造、田口 和己、岡田 淳志、安井 孝周：どのような患者に再発予防が必要か？第 106 回日本泌尿器科学会総会、2018. 4. 19-22、京都市
- ⑧岡田 淳志、青木 啓将、小野里 太智、加藤 大貴、田中 勇太郎、杉野 輝明、海野 怜、田口 和己、瀧本 周造、安藤 亮介、坂下 真大、松永 民秀、安井 孝周：尿路結石溶解療法に向けた iPS 細胞由来のマクロファージを用いた創薬。第 106 回日本泌尿器科学会総会、2018. 4. 19-22、京都市
- ⑨Hamamoto Shuzo, Okada Shinsuke, Inoue Takaaki, Unno Rei, Taguchi Kazumi, Ando Ryosuke, Okada Atsushi, Honma Hideki, Miura Hiroyasu, Matsuda Tadashi, Yasui Takahiro: Establishment of treatment strategies for impacted calculi by analyzing the ureteroscopic findings in TUL. 第 106 回日本泌尿器科学会総会、2018. 4. 19-22、京都市、2018 年
- ⑩Yasui Takahiro: Japanese topics for stone management -epidemiology, endoscopic surgery, and prevention. 16th Urological Association of Asia Congress 2018, 2018. 4. 17-21, Kyoto, Japan, 2018
- ⑪Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Tanaka Yutaro, Sugino Teruaki, Unno Rei, Ando Ryosuke, Okada Atsushi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Discovery of a novel gene expression profile of renal papilla including Randall's plaque from calcium phosphate over calcium oxalate stone formers. The 33rd Annual EAU Congress, 2018. 3. 16-20, Copenhagen, Denmark, 2018 年
- ⑫Hamamoto 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
- ⑬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、郡健二郎、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
- ⑭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
- ⑮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、郡健二郎、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
- ⑯Usami 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

⑰Okada 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

⑱Fujii 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

⑲Itoh 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

⑳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、郡健二郎、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

㉑Okada 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

㉒Taguchi 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

㉓Itoh 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

㉔Taguchi 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

〔図書〕(計 3件)

①田口 和己、杉野 輝明、海野 怜、藤井 泰普、瀧本 周造、安藤 亮介、岡田 淳志、安井 孝周：科学評論社、特集Ⅱ M2マクロファージと疾患 腎結石。臨床免疫・アレルギー科、70(1):53-59、2018

②安井孝周、岡田淳志、瀧本周造、田口和己、海野怜、杉野輝明：科学評論社、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

③ 岡田淳志、田口和己、安井孝周：医歯薬出版、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 0 件)

〔その他〕

ホームページ等：<https://ncu-uro.jp>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：郡 健二郎

ローマ字氏名：(KOHRI kenjiro)

所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：その他部局等
職名：学長
研究者番号（8桁）：30122047

研究分担者氏名：安井 孝周
ローマ字氏名：(YASUI takahiro)
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：40326153

研究分担者氏名：戸澤 啓一
ローマ字氏名：(TOZAWA Keiichi)
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：40264733

研究分担者氏名：岡田 淳志
ローマ字氏名：(OKADA Atsushi)
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：70444966

研究分担者氏名：濱本 周造
ローマ字氏名：(HAMAMOTO shuzo)
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：講師
研究者番号（8桁）：80551267

研究分担者氏名：田口 和己
ローマ字氏名：(TAGUCHI kazumi)
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：00595184

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。