

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11188

研究課題名（和文）腎臓分化誘導因子が関わる結石形成機序の解明と治療法への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of the kidney stone formation related by kidney differentiation inducing factor and its application to treatment

研究代表者

藤井 泰普（Fujii, Yasuhiro）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：30566229

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：C57BL/6Jマウスに対してグリオキシル酸（GOX）100mg/kgを6日間腹腔内投与し、正常マウスと比較検討したところ、GOX投与群では尿中カルシウムの増加を認めた。結石形成はGOX投与群に認められた。また、腎におけるlipocalin2の遺伝子・蛋白はGOX投与群では高発現を認めた。一方、braf、MEK、ERK、E-cadherin、TGF β の発現はGOX投与群で低発現を認めた。in vitro研究も同様の結果であった。次いで、GOXと同時にlipocalin2を腹腔内投与し、lipocalin2非投与群と比較検討した結果は各遺伝子、蛋白の発現に有意差を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎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る。そのため、成因の究明による再発予防法の開発は急務である。腎結石は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（OPN）などが同定され、遺伝子レベルで腎結石の病態解明が進んでいる。本研究の結果では、結石形成における腎臓分化誘導因子であるlipocalin2が結石形成におけるpromotorおよびinhibitorとは断言できず、ノックアウトマウスを用いた研究による機能解明を行う必要があると考える。

研究成果の概要（英文）：After injection of glyoxylate(GOX) to C57BL/6J mouse for six days, we confirmed the increase of urinary calcium in the GOX administrated group. And we detected the urolithiasis in the GOX administrated group. In addition, the gene and protein of lipocalin2 in the kidney accepted high expression in the GOX administrated group. On the other hand, the expressions of braf, MEK, ERK, E-cadherin, and TGF β accepted low expression in the GOX administrated group. In vitro study, there were similar results. Then, we gave lipocalin2 in addition to GOX. We did not recognize significant differences for these expression of genes and proteins in comparison with lipocalin2 non-administrated group.

研究分野：尿路結石

キーワード：尿路結石 シュウ酸カルシウム lipocalin2

1. 研究開始当初の背景

腎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^[1]、欧米では20人にも達する国もみられる。そのため、成因の究明による再発予防法の開発は急務である。腎結石は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(OPN)などが同定され、遺伝子レベルで腎結石の病態解明が進んでいるが、未だ予防法に応用されていない。結石モデルマウスで結石形成時に近位尿細管細胞傷害および酸化ストレスが関与することを証明した。さらに、私たちは、メタボリックシンドローム(MetS)における結石モデルマウスを用いたDNAマイクロアレイ解析で新たな結石関連遺伝子としてlipocalin2を同定した。

2. 研究の目的

腎結石の罹患率は急増し、再発率が高く、予防法や治療法の確立は急務である。しかし、結石の再発や治療において指標となるバイオマーカーは報告がない。これまでに私たちは、腎結石は肥満者に多いことやメタボリックシンドロームと強く関連していることを明らかにしてきた。さらに、腎結石形成の初期過程において細胞障害を伴うことをモデルマウスを用いて証明してきた。その過程においてDNAマイクロアレイ解析によって新たな結石関連遺伝子として、腎における炎症および腎障害マーカーであるlipocalin2を同定した。これらの研究成果を踏まえ、本研究では、lipocalin2の腎結石形成における機能を解明する。さらに、治療法と腎結石発症のバイオマーカーの開発に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

研究1: 腎結石形成におけるlipocalin2の作用機序の解明

(in vivo 研究) C57BL/6Jマウスを用いてシュウ酸前駆物質であるグリオキシル(GOX) 100mg/kgを6日間腹腔内投与し、正常マウスと比較検討する。

(a) 結石関連物質

投与0、5日目に24時間蓄尿を行い、シュウ酸、クエン酸、カルシウム、リン、マグネシウムなどの結石関連物質の尿中排泄量を測定する。また、投与0、6日目にsacrificeし、血清を採取する。血清から結石関連物質(カルシウム、リン、マグネシウム、クレアチニン)を測定する。

(b) 結石形成量

摘出腎からはPizzolato染色と偏光顕微鏡により結石形成を確認し、結石形成量を定量化する。

(c) lipocalin2、MAPK経路、サイトカイン

摘出腎においてlipocalin2、MAPK経路(braf、MEK、ERK、E-cadherin)、サイトカイン(TGF等)の各遺伝子・蛋白発現を定量PCR、免疫組織染色、western blottingにて評価する。

(in vitro 研究) マウス腎尿細管細胞(M-1)にシュウ酸(0.1、0.5、1.0mM)およびシュウ酸カルシウム結晶(50、100、150、200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)を添加し以下の項目の経時的変化を調べる。

(d) シュウ酸カルシウム結晶の尿細管細胞への付着能

尿細管細胞へ付着しているシュウ酸カルシウム結晶を定量的に評価する。

(e) lipocalin2、MAPK経路、サイトカイン抽出した腎尿細管細胞を回収し、lipocalin2、MAPK経路(braf、MEK、ERK、E-cadherin)、サイトカイン(TGF等)を蛍光免疫染色し、画像的評価を行う。さらに、定量PCR、ELISA、western botting法を用いて定量化し比較する。

研究2: lipocalin2による結石治療法の開発

(in vivo 研究) C57BL/6Jマウスにシュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸 100mg/kgを6日間腹腔内により投与し、同時にlipocalin2を尾静脈より投与し、非投与群と以下の項目を比較検討する。

(a) 結石関連物質 (b) 結石形成量・形態 (c) lipocalin2、MAPK経路、サイトカイン (in vitro) マウス腎尿細管細胞(M-1)にシュウ酸カルシウム結晶とlipocalin2を添加し、以下の項目の経時的変化を検討する。 (d) シュウ酸カルシウム結晶の尿細管細胞への付着能 (e) lipocalin2、MAPK経路、サイトカイン

研究3: 腎結石バイオマーカーへの応用

結石形成モデル動物、ヒトにおいて投与0、6日目にsacrificeし、血清を採取する。また、投与0、5日目に24時間蓄尿を行い、結石尿を採取する。得られた血清および尿中lipocalin2についてELISA法を用いて定量化する。

4. 研究成果

研究1: 腎結石形成における lipocalin2 の作用機序の解明

(in vivo) C57BL/6J マウスを用いてシュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸 (GOX) 100mg/kg を6日間腹腔内投与し、正常マウスと比較検討したところ、結石関連物質として血中および尿中のシュウ酸、クエン酸、カルシウム、リン、マグネシウム、クレアチニンのうち GOX 投与群では尿中カルシウムの増加を認めた ($p < 0.05$)。結石形成は GOX 投与群に認められた。また、腎における lipocalin2 の遺伝子・蛋白は GOX 投与群で高発現を認めたが、braf、MEK、ERK、E-cadherin、TGF の各遺伝子・蛋白発現は GOX 投与群で低発現を認めた ($p < 0.05$)。in vitro 研究: マウス腎尿細管細胞 (M-1) にシュウ酸カルシウム結晶を添加した群では、lipocalin2、braf、MEK、ERK、E-cadherin、TGF の各遺伝子・蛋白発現は in vivo と同様の結果となった。

研究2: lipocalin2 による結石治療法の開発

(in vivo) C57BL/6J マウスに GOX 100mg/kg を6日間腹腔内投与し、同時に lipocalin2 を腹腔内投与し、lipocalin2 非投与群と比較検討した。結石関連物質の測定、結石形成量、lipocalin2、braf、MEK、ERK、E-cadherin、TGF の各遺伝子・蛋白発現に有意差は認めなかった。in vitro 研究: マウス腎尿細管細胞 (M-1) にシュウ酸カルシウム結晶と lipocalin2 を添加し、非添加群と検討した。シュウ酸カルシウム結晶の尿細管細胞への付着能は有意差を認めなかったが、lipocalin2 の遺伝子・蛋白は高発現を認めた。braf、MEK、ERK、E-cadherin、TGF に関しては2群間で有意差を認めなかった。

研究3: 腎結石バイオマーカーへの応用

研究1、2の結果よりバイオマーカーへの応用は困難と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Taguchi Kazumi, Cho Yan Sung, Ng CF Anthony, Usawachintachit Manint, Deng Liang Yao, Shen Cheng-Huang, Gyawali Prem, Alenezi Husain, Basiri Abbas, Bou Sopheap, Djojodemedjo Tarmono, Sarica Kemal, Shi Lei, Singam Praveen, Singh Kumar Shrawan, Yasui Takahiro	4. 巻 26
2. 論文標題 The Urological Association of Asia clinical guideline for urinary stone disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 688-709
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iju.13957.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Okada Atsushi, Aoki Hiromasa, Onozato Daichi, Kato Taiki, Hashita Tadahiro, Takase Hiroshi, Sugino Teruaki, Unno Rei, Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Mizuno Kentaro, Tozawa Keiichi, Matsunaga Tamihide, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Active phagocytosis and diachronic processing of calcium oxalate monohydrate crystals in an in vitro macrophage model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Kidney and Blood Pressure Research	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000501965	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Taguchi Kazumi, Sugino Teruaki, Fujii Yasuhiro, Hamamoto Shuzo, Unno Rei, Ando Ryosuke, Kamiya Hiroyuki, Okada Atsushi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro
2. 発表標題 Surgical hand hygiene does not influence the onset of surgical site infection in an endourological surgery.
3. 学会等名 34th Annual EAU Congress（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Unno Rei, Kawabata Tsuyoshi, Takase Hiroshi, Sugino Teruaki, Tanaka Yutaro, Unno Naoko, Fujii Yasuhiro, Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Okada Atsushi, Kamiya Hiroyuki, Yasui Takahiro
2. 発表標題 Deregulated mTOR is responsible for autophagy defect exacerbating kidney stone development.
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 海野 怜、海野 奈央子、田口 和己、藤井 泰普、瀧本 周造、安藤 亮介、岡田 淳志、神谷 浩行、本間 秀樹、郡 健二郎、安井 孝周
2. 発表標題 オステオポンチン抗体により尿路結石と動脈硬化は抑制される。
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇佐美 雅之、岡田 朋記、田中 勇太郎、杉野 輝明、海野 怜、藤井 泰普、伊藤 靖彦、田口 和己、瀧本 周造、安藤 亮介、岡田 淳志、郡 健二郎、安井 孝周
2. 発表標題 ミトコンドリア抗酸化防御遺伝子Nntによる腎シュウ酸カルシウム結晶形成と活性酸素種(ROS)への影響について。
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井 泰普、田口 和己、海野 怜、瀧本 周造、安藤 亮介、岡田 淳志、神谷 浩行、安井 孝周
2. 発表標題 術者の手指消毒は泌尿器内視鏡手術における手術部位感染の発症に影響しない。
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田口 和己、長谷部 憲一、河瀬 健吾、岡田 朋記、茶谷 亮輔、杉野 輝明、田中 勇太郎、海野 怜、藤井 泰普、廣瀬 泰彦、宇佐美 雅之、伊藤 靖彦、瀧本 周造、安藤 亮介、岡田 淳志、戸澤 啓一、郡 健二郎、安井 孝周
2. 発表標題 骨密度が影響を及ぼす尿路結石症患者の臨床アウトカムの横断的及び縦断的関連解析。
3. 学会等名 日本尿路結石症学会第29回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田口 和己、河瀬 健吾、田中 勇太郎、杉野 輝明、海野 怜、加藤 大貴、藤井 泰普、廣瀬 泰彦、宇佐美 雅之、瀧本 周造、安藤 亮介、岡田 淳志、戸澤 啓一、郡 健二郎、安井 孝周
2. 発表標題 マクロファージの研究から国際共同研究へ。
3. 学会等名 日本尿路結石症学会第29回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田口 和己、瀧本 周造、藤井 泰普、長谷部 憲一、河瀬 健吾、海野 怜、安藤 亮介、岡田 淳志、神谷 浩行、安井 孝周
2. 発表標題 順行性尿管碎石術 (Antegrade URS) による嵌頓結石の治療成績。
3. 学会等名 第33回日本泌尿器内視鏡学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 岡田 淳志、田中 勇太郎、杉野 輝明、海野 怜、加藤 大貴、田口 和己、藤井 泰普、廣瀬 泰彦、伊藤 靖彦、宇佐美 雅之、小林 隆宏、瀧本 周造、安藤 亮介、戸澤 啓一、郡 健二郎、安井 孝周	4. 発行年 2019年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 366-374
3. 書名 腎臓内科・泌尿器科	

1. 著者名 藤井 泰普、安井 孝周	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 1887-1889
3. 書名 臨床雑誌 内科	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	安井 孝周 (Yasui Takahiro) (40326153)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	岡田 淳志 (Okada Atsushi) (70444966)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	
研究分担者	安藤 亮介 (Ando Ryosuke) (30381867)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	濱本 周造 (Hamamoto Shuzo) (80551267)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師 (23903)	
研究分担者	田口 和己 (Taguti Kazumi) (00595184)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教 (23903)	
研究分担者	戸澤 啓一 (Tozawa Keiichi) (40264733)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	