

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09201

研究課題名(和文) 尿路結石の新規関連遺伝子Nntによる抑制機構の解明と予防治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the suppression mechanism and application to preventive treatment by the novel related gene Nnt of urolithiasis

研究代表者

宇佐美 雅之 (Usami, Masayuki)

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：30534755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：B6JおよびB6N 亜系統マウスそれぞれのNnt遺伝子全長クローニングを行い、導入ベクターを作製した。Nntトランスジェニックマウスによる結石抑制機序の解明については、Nntクローニングベクターの作製には成功したものの、動物愛護の観点からin vitroでの研究を優先することとし、培養細胞などを用いた研究を優先した。ベクターを培養細胞にトランスフェクションすることにより、Nntが過剰に発現した状態での変化を亜系統間の状況を再現して検討することが可能であり、酸化ストレスの評価を行った。ただし、ROS活性の定量法について安定した結果が得られず、測定法の再検討が必要となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿路結石は多因子疾患であり、遺伝因子に環境因子が作用して発症する。しかしその発症機序は不明であり、より詳細な解明が必要である。遺伝因子の研究には、近交系マウスが用いられることが多く、わずかな遺伝的差異が生じた亜系統が存在する。私たちは、亜系統マウスにおいて結石形成に差があることに着目し、Nnt遺伝子が結石形成を抑制していることを見出した。本研究は、新たな尿路結石抑制遺伝子候補であるNntの機能を解析することで、尿路結石の形成機序をより明らかにし、予防法に応用することへとつながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Full-length cloning of the Nnt gene for each of the B6J and B6N substrain mice was performed and prepare an introduction vector. Regarding the elucidation of the mechanism of stone suppression by Nnt transgenic mice, although we succeeded in producing Nnt cloning vector, we decided to prioritize in vitro research from the viewpoint of animal protection, and prioritize research using cultured cells. By transfecting the vector into cultured cells, it was possible to reproduce and examine the changes in the state where Nnt was overexpressed, and to evaluate the oxidative stress. However, stable results were not obtained for the quantification method of ROS activity, and it was necessary to reexamine the measurement method.

研究分野：尿路結石症

キーワード：尿路結石症 Nnt 疾患関連遺伝子 腎結晶形成モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

尿路結石の罹患率は世界中で増加しており、医療経済を圧迫する要因となっている。またその再発率は5年で40~50%と高率であり、形成機序の解明と予防・治療法の開発が望まれる。尿路結石成分の中でも80%以上を占めるカルシウム含有結石は、遺伝因子に環境因子が影響し発症すると考えられているものの、詳細な発症機序はいまだ解明されていない。そのため、これまでの尿路結石の治療法は、自然排石や、排石困難例に対する外科的手術が中心であり、その病態解明が新たな内服治療法の開発につながると考えられる。

遺伝因子の研究には近交系マウスが多く用いられるが、私たちはマウスにシュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸を腹腔内投与することにより、結石モデルマウスを作成することに成功した¹⁾。この研究を行う過程において、結石形成量にばらつきがあることが認められ、手技や条件などの様々な原因を追及した。その結果、各研究にて用いたマウスの亜系統が違っていたことが判明した。用いた近交系はC57BL/6マウスであるが、この近交系にはC57BL/6J (B6J)マウスとC57BL/6N (B6N)マウスの亜系統が存在し、遺伝学的に差異があることが報告されている²⁾。この亜系統間では、結石形成量に差を認めたことに着目し、その原因はなんらかの遺伝子発現変化が関与しているのではないかとこの着想に至り、本研究を行うこととした。

2. 研究の目的

近年の尿路結石研究では、遺伝子発現の解析や関連遺伝子の同定に注目がおかれている。尿路結石予防などの治療薬の開発を目指し、多くの研究がなされてきたが、臨床応用に至る予防法や予防薬の開発には残念ながら未到達である。尿路結石の発症については、いまだ不明確な部分が多く、発症機序のより詳細な解明が必要と考えられるが、他施設共同によるGenome-wide SNP関連解析・マイクロアレイを用いた関連遺伝子解析が行われ、炎症や酸化ストレス、細胞障害に関与した関連遺伝子が多数同定されている。その中で酸化ストレス抑制因子と考えられるNnt遺伝子が結石形成を抑制している可能性が見いだされた。本研究により、Nntが尿細管上皮細胞における酸化ストレスを減少させ、結石形成を抑制することが証明でき、結石形成機序の一端を解明できる。これにより予防法や予防薬の開発につながる可能性が示唆される。

3. 研究の方法

(1) 尿路結石関連遺伝子の同定

亜系統結石モデルマウスによる尿路結石形成量の検討：

8週齢雄のB6JおよびB6N(各N=15)に対し、グリオキシル酸80mg/kgを12日間腹腔内投与し、6日毎に腎検体を採取した。併行して24時間蓄尿を行い、尿中シュウ酸、クエン酸、カルシウム、リン、マグネシウム排泄などの結石関連物質を測定した。採取した腎は、4%パラフォルムアルデヒドによる固定にてシュウ酸カルシウム結石染色(Pizzolato染色)を行い、偏光顕微鏡による観察にて結石形成量を定量し比較した。

尿路結石関連遺伝子の同定：

にて採取した腎からRNAを回収し、cDNAを作製した。B6JとB6Nの亜系統間において、遺伝子上の塩基配列に差が報告されている6遺伝子(Naaladl2、Aplp2、Lims1、Fgf14、Snap29、Nnt)について、腎における発現量を定量PCR法により比較した。

(2) Nntによる結石抑制効果の検討

NntによるROSを介した結石抑制効果の検討：

研究1と同時に採取した腎をメタカン(メタノール:クロロホルム:氷酢酸=6:3:1)液により固定し、Carbonyl Protein Immunostaining Kit®(シマ研究所)にて免疫染色を行い、ROS活性を検討した。

培養細胞による解析：

1)ヒト腎由来細胞株であるHK-2およびマウス腎由来細胞株であるM-1を用い、Nnt cloning vectorおよびsiRNAをトランスフェクションした状況を作成する。2)1)にさらに蛍光標識したシュウ酸カルシウム一水和物(COM)結晶を37にて20分間暴露させる。3)培養液ごとCOM結晶を洗浄した後、付着しているCOM結晶量を蛍光顕微鏡による観察と画像解析ソフトであるImage pro plusを用いて定量化し比較する。

(3) Nntトランスジェニックマウスによる結石抑制機序の解明

Nnt cloning vectorの作製：

マウスNnt遺伝子について、B6NおよびB6J由来cDNAを用い、promotor領域を含む全長をlong PCR法を用いてcloningした。作製したPCR productをpGEM®-T Easy (Promega) vectorへ挿入し、大腸菌に形質転換した後、37にて一晚培養し、発色確認のうえシークエンス法にてcloningの成否を確認した。

Nntトランスジェニックマウスの作製：

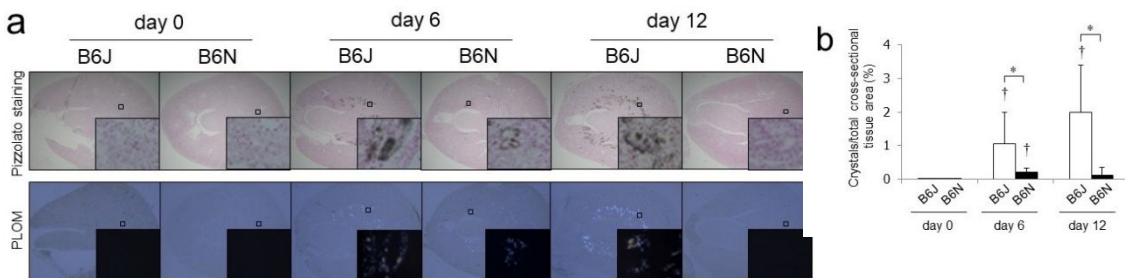
Nnt cloning にて作成したプラスミドを **B6J** マウスの受精卵にマイクロインジェクションしたのち、偽妊娠させた **C57BL/6** の卵管内へ移植し、トランスジェニックマウスを作成する。遺伝子導入マウスを十分に繁殖させ、導入 **Nnt** 発現の安定した系統を選定し研究に用いる。実際に腎組織における **Nnt** 発現は **exon7-11** 領域の **genomic PCR** 法、**Western Blotting** 法、免疫染色を用いて確認する。

4. 研究成果

(1) 尿路結石関連遺伝子の同定

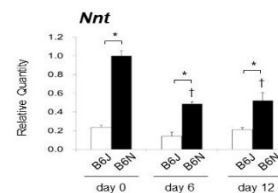
亜系統結石モデルマウスによる尿路結石形成量の検討：

Day0 においては **B6J・B6N** とともに腎に結晶の沈着を認めなかった。両群ともに、**Day6** 以降において腎皮髄境界部の尿細管内にシュウ酸カルシウム結石の沈着を認めた。認められた結石形成量を定量化し比較したところ、経時的に結石形成量は増加し、**Day6・Day12** において、**B6J** は **B6N** に比べて有意に多いことが確認された。



尿路結石関連遺伝子の同定：

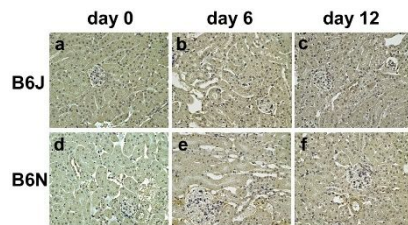
SNP を持つ遺伝子 (**Naaladl2**, **Aplp2**, **Lims1**, **Fgf14**, **Snap29**) は、いずれも発現量に有意な差を認めなかった (**Naaladl2** については評価不能であった)。**Deletion** 遺伝子である **Nnt** については、**Day0** において **B6J** は **B6N** と比べて発現量が有意に低下しており、その後のいずれの経過においても同様の結果であった。



(2) Nnt による結石抑制効果の検討

Nnt による **ROS** を介した結石抑制効果の検討：

B6J・B6N とともに腎組織全体にカルボキシル化タンパクの発現を認めた。**Day0** において **B6J** では高い発現を認め、**Day6・Day12** においてもその高い発現は持続していた。**B6N** では、**Day0** と比較し、**Day6・Day12** において発現は高くなっていった。いずれの経過においても **B6J** では **B6N** と比べて発現が高い傾向を認めた。

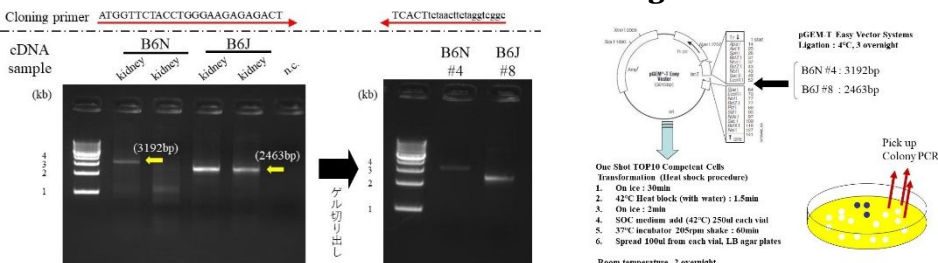


培養細胞による解析：

ヒト腎由来細胞株である **HK-2** およびマウス腎由来細胞株である **M-1** に対し、蛍光標識したシュウ酸カルシウム水和物 (**COM**) 結晶を **37** にて **20** 分間暴露させる方法にて、結晶付着率および培養液中の **ROS** 活性を検討する予定であり、条件設定は可能となったものの、**ROS** 活性の定量法について安定した結果が得られず、測定法の再検討が必要となった。

(3) Nnt トランスジェニックマウスによる結石抑制機序の解明

Nnt cloning vector の作製：マウス **Nnt** 遺伝子について、**B6N・B6J** 各由来の **cDNA** を用い、**promotor** 領域を含む全長を **long PCR** 法を用いて **cloning** した。作製した **cDNA** を **pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega)** を用いて、**pGEM®-T Easy Vector** に組み込んだ。作製した **vector** は、**TOP10 Competent Cell** に形質転換した後、**37** にて一晚培養し、発色確認のうえシーケンス法にて **cloning** の成否を確認した。



Nnt トランスジェニックマウスの作製：

Nnt クローニングベクターの作製には成功したものの、動物愛護の観点から **in vitro** で

の研究を優先することとし、培養細胞などを用いた研究成果が確認できた後に行う方針とした。

<引用文献>

[1] Okada A. et al. :Urol Res 35:89-99, 2007

[2] Mekada K. et al. :Exp Anim 58:141-9, 2009

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 宇佐美雅之、安井孝周	4. 巻 88
2. 論文標題 尿路結石のすべて【トピックス】ゲノムワイド関連解析による尿路結石症関連遺伝子の探索	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 296～301
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Usami Masayuki, Okada Atsushi, Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro	4. 巻 46
2. 論文標題 Genetic differences in C57BL/6 mouse substrains affect kidney crystal deposition	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Urolithiasis	6. 最初と最後の頁 515～522
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00240-018-1040-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中勇太郎、岡田淳志、丸山美帆子、田尻理恵、河瀬健吾、杉野輝明、海野怜、田口和己、瀧本周造、宇佐美雅之、安藤亮介、吉村政志、森勇介、郡健二郎、安井孝周
2. 発表標題 隕石学・鉱物学的技術を応用した二次元マッピング法による尿路結石の多面的構造解析の検討
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇佐美雅之、金本一洋、橋本良博、岩瀬豊、山田健司、海野奈央子、瀧本周造、岡田淳志、戸澤啓一、安井孝周
2. 発表標題 当院でのECIRS手術症例および合併症の検討
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020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～2020年

1. 発表者名 宇佐美 雅之、杉野 輝明、海野 怜、田口 和己、瀧本 周造、安藤 亮介、岡田 淳志、戸澤 啓一、郡 健二郎
2. 発表標題 尿路結石の新規関連遺伝子Nntが腎に与える酸化ストレスへの影響と尿路結石抑制について
3. 学会等名 第106回 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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)	

6. 研究組織（つづき）

	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	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 (Tguchi Kazumi) (00595184)	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	海野 怜 (Unno Rei) (40755683)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員 (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関