

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791520

研究課題名(和文) 遺伝子変異マウスを用いた尿路結石形成におけるオステオポンチン機能部位の解明

研究課題名(英文) Effect of impaired functional domains of osteopontin on renal crystal formation: Analyses of OPN transgenic and OPN knockout mice.

研究代表者

東端 祐司 (HIGASHIBATA YUJI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：10381849

研究成果の概要(和文)：本研究は、尿路結石の形成に係わっているオステオポンチン(OPN)の各機能部位の役割を解明することが目的である。特に①OPN 機能部位毎の変異トランスジェニックマウスにシュウ酸前駆物質を投与し、それぞれのマウスで結石の形態が異なることから、機能部位毎に結石形成における役割が異なることを明らかにした。その中で、トロンビン切断により機能する SVVYGLR 配列(マウスでは SLAYGLR 配列)の抗体を作成し、結石が予防できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Osteopontin (OPN) has been described as playing a nonredundant role in renal crystal formation. (1) We investigated the effects of impaired domains of OPN, namely, the Arg-Gly-Asp (RGD) sequence and two calcium-binding sites on crystal formation. We used wild-type mice (WT group), OPN knockout mice (KO group), and OPN knockout mice carrying either a transgene in which the RGD sequence had been modified to Arg-Gly-Glu (RGE group) or whose two calcium-binding sites had been deleted (CaX group). In the WT group, crystal deposits increased gradually at the renal corticomedullary junction in an orderly fashion, whereas those in the KO group were observed sporadically in the renal cortex. In both the CaX and RGE groups, deposits were localized near the corticomedullary junction. Crystal deposition was greatest in the WT group and least in the KO group. The number of deposits in the RGE group was nearly equal to that in the KO group. The results indicated the possibility that each domain contributes to the mechanism by which OPN stimulates crystal formation. (2) We investigated the effects of an antimurine osteopontin antibody (35B6-Ab) that specifically reacts with the (162) SLAYGLR(168) sequence, which is exposed by thrombin cleavage and is located adjacent to the RGD sequence, on renal crystal formation. Scanning electron microscopy showed that the crystals in 35B6-Ab-treated mice were aberrantly formed and their density was low; in contrast, the crystals in untreated mice that were not administered 35B6-Ab had a radial pattern of growth (rosette petal-like crystals), and their density was high. We conclude that thrombin-cleaved osteopontin plays an important role in formation of renal calcium crystals and that 35B6-Ab contributes to the remarkable inhibition of early-stage renal crystal formation by preventing renal tubular cell injury and crystal-cell attachment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：尿路結石、オステオポンチン、遺伝子組換えマウス

1. 研究開始当初の背景

尿路結石は 90%の無機物質と数%の有機物質（マトリックス）から構成される。オステオポンチン（OPN）は、そのマトリックスの成分の1つとして同定され、結石形成に深く関わっていると考えられている。OPN ノックアウトマウスではシュウ酸カルシウム結晶の形成は、量が抑制されるだけでなく、大きく成長せず砂状にとどまっている。OPN は約 300 のアミノ酸塩基からなり、骨吸収に関与するリン酸化蛋白である。多くの臓器において、石灰化作用、炎症反応、細胞死などの生理的・病理学的反応に関与しているが、その多機能である理由として、構造上の特徴が挙げられる。私たちは、遺伝子操作技術の確立したマウスでの尿路結石研究を行うため、尿路結石モデルマウスの樹立に成功し、OPN ノックアウトマウスを含め、遺伝子組み換えマウスを用いて、結石形成に関わる検討を行ってきたが、その部位による機能の違いは明らかにできていない。

2. 研究の目的

OPN の機能部位である RGD 配列、Ca 結合部位、トロンビン切断部位に着目し、それぞれがどのように尿路結石形成に係わっているかを、トランスジェニックマウスと機能部位に特徴的な抗体を用いて明らかにする。

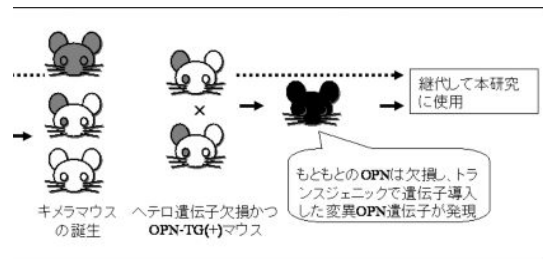
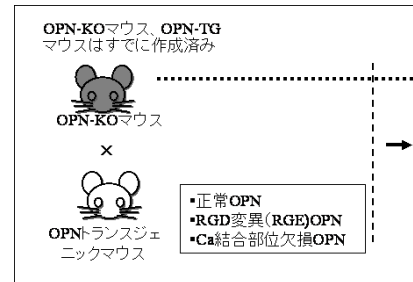
3. 研究の方法

変異 OPN 発現トランスジェニックマウスを用いた OPN 機能部位の解析

OPN-KO マウスと正常 OPN、RGD 配列を RGE に変換した OPN、カルシウム結合部位を欠損した OPN を発現するトランスジェニックマウスを作成した。

OPN-KO マウスでは尿酸前駆物質の投与により、結石が形成されるものの、wild type と比較し、結石形成数が少なく、偏光顕微鏡の観察で結石が小さく成長せず、形成された結石が消失する機能も緩徐であり、OPN は結石の成長、消失に機能していることを本研究開始前に確認している。OPN-KO マウスと変異 OPN トランスジェニックマウスを交配し、wild type 由来の OPN の発現はノックアウトされているものの、トランスジェニックマウス由来のそれぞれの OPN を発現する遺伝子組み換えマウスを作成し、繁殖

を行った。結石モデルマウスと同様に尿酸前駆物質であるグリオキシル酸 100mg を腹腔内投与して結石形成を行い、それぞれの変異オステオポンチンによる結石形成量と形態について検討した。



OPN 特定部位に対する抗体投与による結石抑制効果の検討

合成ペプチド（VDVPNGRGDSLAYGLRS）をウサギに免疫して、精製した IgG を作製した。8 週齢 C57BL/6 マウスを 40 匹用意し、グリオキシル酸の連日腹腔内投与とともに、0、3、6、9 日目に精製した抗体を経静脈的に投与（150 μg、400 μg）し、形成された結石につき、定量的、形態学的評価を行う。全長型 OPN、切断型 OPN の発現は、RT-PCR、免疫染色にて評価した。

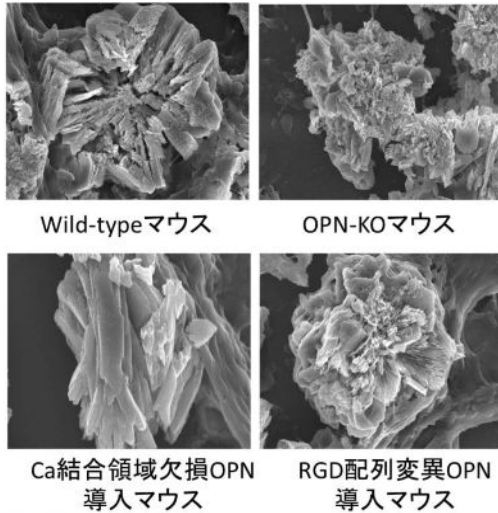
4. 研究成果

変異 OPN 発現トランスジェニックマウスを用いた OPN 機能部位の解析

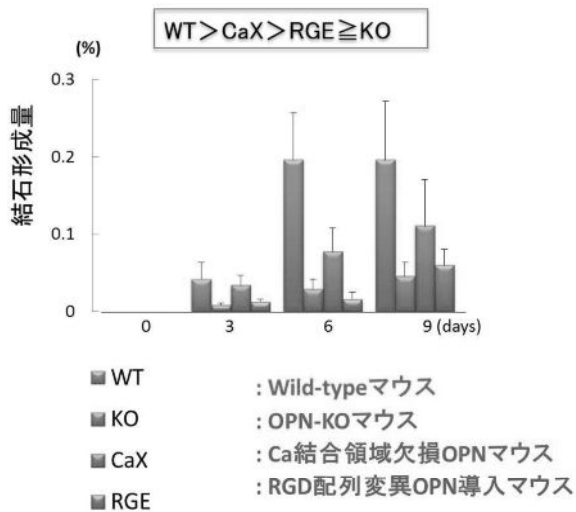
Wild-type と比較し、OPN ノックアウトマウスでは結石が形成されないが、Ca 結合領域欠損 OPN マウスでは結石形成量の全体はやや多く、RGD 配列変異 OPN マウスでは結石形成量が少なかった。

形成された結石の形態を走査型電子顕微鏡で観察すると、wild-type では花弁状に結

石が成長していくのに対して、OPN-KO マウスでは結石が砂状で成長が見られなかった。RGD 配列変異 OPN マウスでは wild-type に対して比較的結石の形態が保たれているが、Ca 結合領域欠損マウスでは結石が周囲に成長していく形態が見られなかった。



RGD配列は結石の量に、カルシウム結合領域は結石の形態に影響を及ぼす。



これらの結果から、OPN の RGD 配列は結石形成量に、カルシウム結合領域は結石の形態に影響を及ぼすことがあきらかになった。結石マトリクスである OPN についてそれぞれの機能部位での結石形成における機能を明らかにすることができた。

OPN 特定部位に対する抗体投与による結石抑制効果の検討

切断型 OPN に対する抗体の投与は濃度依存性に結石の形成を抑制した。抗体投与によっ

て結石が成長せず、崩れやすい形態になることを明らかにした。切断型 OPN に対する抗体投与したマウスでの結石は走査型電子顕微鏡での観察でも密度が低いことが観察された。これらのことから切断型 OPN は結石の成長と個化、結石化に重要な役割を果たすことを明らかにすることができた。

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 1 件)

- Masahito Hirose, Keiichi Tozawa, Atsushi Okada, Shuzo Hamamoto, Yuji Higashibata, Bing Gao, Yutaro Hayashi, Hisao Shimizu, Yasue Kubota, Takahiro Yasui, Kenjiro Kohri: Role of osteopontin in early phase of renal crystal formation: immunohistochemical and microstructural comparisons with osteopontin knock-out mouse. Urological Research. 2012; 40 (2): 121-129

[学会発表] (計 3 件)

- 田口和己、岡田淳志、安井孝周、市川潤、新美和寛、宇佐美雅之、小林隆宏、濱本周造、東端裕司、戸澤啓一、郡健二郎. マクロファージ走化因子欠損マウス (op/op) を用いた尿路結石の形成および自然消失における M1・M2 マクロファージの機能解明. 日本尿路結石症学会第 21 回学術集会 (千葉市) 2011. 8. 26-27 (8. 27 発表)
- 市川潤、岡田淳志、安井孝周、廣瀬泰彦、藤井泰普、新美和寛、東端裕司、伊藤恭典、戸澤啓一、郡健二郎. 腎尿細管上皮細胞と脂肪細胞との共培養条件による結石関連パラクラインシステムの解明. 日本尿路結石症学会第 21 回学術集会 (千葉市) 2011. 8. 26-27 (8. 27 発表)
- 広瀬真仁、安井孝周、岡田淳志、小林隆宏、安藤亮介、濱本周造、東端裕司、伊藤恭典、戸澤啓一、郡健二郎. 尿路結石全国疫学調査を用いた地域別有病率と国民健康・栄養調査との相関. 日本尿路結石症学会第 21 回学術集会 (千葉市) 2011. 8. 26-27 (8. 26 発表)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東端 祐二 (HIGASHIBATA YUJI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：10381849