

## 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 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591797

研究課題名（和文） NF- $\kappa$ B 阻害薬による尿路結石治療に向けた基礎的研究研究課題名（英文） Anti-NF- $\kappa$ B reagents for prevention of urinary stone

## 研究代表者

戸澤 啓一（TOZAWA KEIICHI）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40264733

## 研究成果の概要（和文）：

これまで私たちは、尿路結石の成因を動脈硬化症との類似点、特にNF- $\kappa$ Bとの関連から解明しようと研究を重ねてきた。その結果、NF- $\kappa$ Bにより誘導される多くの蛋白（OPN、MCP-1等）が炎症を惹起し、マクロファージが誘導され、結石関連蛋白を貪食した後、泡沫化し、シュウ酸カルシウム等と結合して結石の核となることを証明してきた。さらにわれわれは、腎尿細管細胞で、酸化ストレスやシュウ酸刺激がNF- $\kappa$ Bを活性化することを見いだした。最近では、尿路結石形成時に、マクロファージが誘導され、M1マクロファージとM2マクロファージではその作用に相違があること、アポトーシスに陥った尿細管細胞のミトコンドリアが崩壊して結石原基となることを電顕で確認している。最終的に、種々の刺激によりマクロファージを中心とした炎症反応が連鎖的に起こり、結石形成につながると考えられる。

現在の生活習慣は、脂肪蓄積・肥満を介して、糖尿病、高脂血症、高血圧、動脈硬化症といった生活習慣病を引き起こす。本研究では、尿路結石症の病態にアディポサイトカインの遺伝子発現が関連していることを明らかにし、治療への応用が可能であることを証明した。

さらに、動脈硬化症の発生・進展への関与が報告されているサイトカイン、接着分子、NF- $\kappa$ B・RANK- RANKLシグナル伝達系が尿路結石形成でも同様の働きをしていると考え研究を行った。RANK- RANKLシグナル伝達系の尿路結石形成への関与は証明できなかった。NF- $\kappa$ Bは、酸化ストレスなど多くの細胞外刺激により活性化された。引き続いて、炎症性サイトカイン、マクロファージの活性化が促進され、NF- $\kappa$ Bが、尿路結石形成に重要な役割を果たすことが確認された。

## 研究成果の概要（英文）：

The present lifestyle causes lifestyle-related diseases, such as diabetes, hyperlipidemia, hypertension, and arteriosclerosis, through fat accumulation and overweight.

In this research, it showed clearly that the gene expression of adipocytokines relates to the morbidity of a urinary stone disease, and proved that the application to medical treatment is possible.

Furthermore, the cytokine promotes adhesion molecules and NF-kappa B-RANK- RANKL signal, and so progress of arteriosclerosis. Same signal transduction inquired by considering that urolithiasis formation is also carrying out the same mechanism. The correlation to urinary stone formation of a RANK- RANKL signal transfer system was not able to be proved.

NF-kappa B was activated by many extracellular stimuli, such as oxidant stress. Then, activation of inflammatory cytokine and a macrophage was promoted and it was checked that NF-kappa B plays an important role for urolithiasis formation.

交付決定額

(金額単位：円)

交付決定額	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、アヂポサイトカイン、転写因子、生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

尿路結石は先進国において増加傾向にあり、今や約 10%もの発生となり、また再発率は約 40%と高いことからその成因の究明と再発予防の開発は、世界的な緊急課題になっている。私達は尿路結石マトリックス成分の 1 つとして OPN を分子生物学的手法を用いて同定した。また、結石形成時には腎遠位尿細管細胞で OPN の発現が増えることを見いだした。さらに、腎尿細管培養細胞は蔞酸 Ca 結晶との結合が強く、細胞内の OPN の発現を抑制すると結晶との結合が低下することを報告した。最近では、OPN の promotor 領域に存在する特定の転写因子 Runts family のひとつ PEBP2 $\alpha$  A/CBFA1 が骨組織において OPN の発現部位に一致して発現していること、PEBP2 $\alpha$  A/CBFA1 が ets family のひとつ ETS1 と協調して OPN の遺伝子発現を転写制御していることなどを明らかにしてきた。また、以前より、炎症により誘導される多くのサイトカイン、接着分子が尿路結石のマトリックス蛋白として重要な役割を果たしていることを確認している。

尿路結石症は生活習慣病の一つであり、その発症機序、転写因子 NF- $\kappa$ B によって病態形成が促進されること、炎症との関連、オステオポンチンの関与など、動脈硬化症と多くの共通点をもつ。現代の生活習慣は、脂肪蓄積・肥満を介して、糖尿病、高脂血症、高血

圧、動脈硬化症といった生活習慣病を引き起こす。

2. 研究の目的

私たちはこれまで酸化ストレスが尿細管に与える影響と結石形成の関係についても報告を行ってきた。要約すると、炎症、低酸素状態（虚血）などの内的要因によるストレスによって尿細管細胞で活性酸素、活性窒素、フリーラジカルが生成される。これらによりアポトーシスに陥る細胞が出現したり、NF- $\kappa$ B が活性化されてオステオポンチンなどの結石関連蛋白が誘導される破骨細胞では RANKL が酸化ストレスによるアポトーシスを抑制することも報告されている。破骨細胞では RANKL が酸化ストレスによるアポトーシスを抑制することも報告されている。破骨細胞では RANKL が酸化ストレスによるアポトーシスを抑制することも報告されている。以上の事象から RANK- RANKL シグナル伝達系が腎での尿路結石形成にも関与している可能性が強く示唆されるが、これまで腎組織、特に腎尿細管細胞における RANK- RANKL シグナル伝達系に関してはほとんど報告されていない。本研究では、動脈硬化症の発生・進展への関与が報告されているサイトカイン、接着分子、NF- $\kappa$ B・RANK- RANKL シグナル伝達系が尿路結石形成でも同様の働きをしているか否かを調べた。

### 3. 研究の方法

動脈硬化症発症に重要な役割を果たしている NF- $\kappa$ B と骨代謝シグナル RANK-RANKL シグナル伝達系の活性化の有無を、まず腎尿管系細胞株を用いて確認する。結石形成には各種サイトカインやマクロファージの関与が報告されているが、これらは、COM 結晶刺激、NO、蔞酸負荷など様々な刺激により発現誘導される。尿管細胞内でのシグナル伝達の起点となっているのは転写因子 NF- $\kappa$ B である。NF- $\kappa$ B の活性化は動脈硬化症での粥状プラーク形成における重要な促進機転である。この NF- $\kappa$ B の活性化 (p65 サブユニットの核内移行) について尿管細胞株、尿管結石形成モデルマウスを用いて検討した。また、NF- $\kappa$ B によって遺伝子発現が誘導される炎症関連分子の発現についても検討した。さらに、様々な刺激；蔞酸、酸化ストレス、炎症性サイトカインによる RANK-RANKL シグナル伝達系の活性化に伴い発現誘導される遺伝子群の mRNA、蛋白の発現および結石形成への関与を調べた。最終的には動脈硬化症治療薬、NF- $\kappa$ B 活性化阻害剤、RANK-RANKL 結合阻害剤が尿管結石症治療薬となりうるか否かを検証した。

### 4. 研究成果

種々の酸化ストレス、炎症性サイトカイン刺激、シュウ酸負荷により尿管細胞株 (MDCK, NRK52E) において NF- $\kappa$ B の活性化が証明された。さらに、結石関連蛋白であるオステオポンチン (OPN) の発現が誘導された。しかし、RANKL の発現誘導は認められなかった。次に、結石形成モデル動物での NF- $\kappa$ B の活性化および RANKL、結石関連蛋白の発現の検討を行った。尿管細胞株での検討と同様にシュウ酸前駆物質の投与により NF- $\kappa$ B の活性化が証明された。さらに、結石関連蛋白であるオステオポンチン (OPN) の発現が誘導された。さらに結石形成部位においてマクロファージの遊走がみられた。

また、新規 NF- $\kappa$ B 阻害薬として IKK $\alpha$  阻害剤、IKK $\beta$  阻害剤を用いて、尿管細胞における NF- $\kappa$ B 活性化への影響を調べた。いずれの薬剤でも NF- $\kappa$ B 活性化阻害は認められ

たが、特に IKK $\beta$  阻害剤で有意に阻害効果が強かった。

### 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 3 件)

- ① Fujii Y, Okada A, Yasui T, Niimi K, Hamamoto S, Hirose M, Kubota Y, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. : Effect of Adiponectin on Kidney Crystal Formation in Metabolic Syndrome Model Mice via Inhibition of Inflammation and Apoptosis. PLoS One. 2013. 8:e61343. doi:10.1371/journal.pone.0061343 (査読有り)
- ② Hirose M, Tozawa K, Okada A, Hamamoto S, Higashibata Y, Gao B, Hayashi Y, Shimizu H, Kubota Y, Yasui T, Kohri K. : Role of osteopontin in early phase of renal crystal formation: immunohistochemical and microstructural comparisons with osteopontin knock-out mice. Urol Res. 2012. 40:121-9, doi:10.1007/s00240-011-0400-z (査読有り)
- ③ Niimi K, Yasui T, Hirose M, Hamamoto S, Itoh Y, Okada A, Kubota Y, Kojima Y, Tozawa K, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. : Mitochondrial permeability transition pore opening induces the initial process of renal calcium crystallization. Free Radic Biol Med. 2012. 52:1207-17. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.005. (査読有り)

[学会発表] (計 0 件)

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

戸澤 啓一 (TOZAWA KEIICHI )  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40264733

(2)研究分担者

郡 健二郎 (KOHRI KENJIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30122047

岡田 淳志 (OKADA ATSUSHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：70444966

広瀬 真仁 (HIROSE MASAHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：70529172

林 祐太郎 (HAYASHI YUTARO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40238134