

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791663

研究課題名(和文)腎結石のマトリックス成分(オステオポンチン)の機能解析と抗体治療への応用

研究課題名(英文)The development of a specific anti-OPN antibody which contributes to the remarkable inhibition of early stage of renal crystal formation

研究代表者

濱本 周造 (Shuzo, Hamamoto)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：80551267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：OPNのRGD配列に隣接し、トロンピンで切断される部位(SLAYGLR配列 マウス)に対する特異的なモノクローナル抗体(35B6抗体)を作成し、培養細胞(in vitro)および実験動物(8週齢雄35BL/6マウス)(in vivo)への投与研究を行ったところ、In vitro、In vivoともに、結石の成長を抑制することが分かった。私たちは抗OPN抗体を用い、結晶の尿細管細胞への接着、結晶の結石化を抑制することで、結石モデル動物における腎結晶形成の予防に成功した。今後、これらの研究が、将来の結石再発予防を目的とした分子標的治療薬の開発の足がかりとなるようにしたい。

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. We have previously shown that the impaired RGD sequence of osteopontin inhibits renal crystal formation by using OPN-transgenic mice and OPN-knockout mice. Here, we investigated the effects of an anti-murine osteopontin antibody (35B6-Ab) that specifically reacts with the 162SLAYGLR168 sequence, which is exposed by thrombin cleavage and is located adjacent to the RGD sequence, on renal crystal formation. 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.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腎結石 オステオポンチン

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、体外衝撃波結石破碎術(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

腎結石形成には結石マトリックス成分の1つであるオステオポンチン(OPN)が強く関わっている。OPNは多くの機能的アミノ酸配列をもち、それらが切断や重合するにより生理活性を生じる。私たちは、結石形成マウスにおいて、非切断型OPNは腎全体に分布しているが、切断型OPNは結晶の形成に一致して腎皮髄境界部に発現するという興味深い現象を見つけた。この現象は、切断型OPNが腎結石の形成に密接に関わっていることを示すものである。そこで本研究では、切断型OPNにて露出されるアミノ酸配列(SLAYGLR)に対する中和抗体を作成し、腎結石の形成抑制作用を検討した。

3. 研究の方法

35B6抗体作成 OPNのSLAYGLR配列を含んだ合成ペプチドで免疫されたマウスからモノクローナル抗体を作成した。*In vitro*実験 イヌ遠位尿細管上皮(MDCK)細胞に放射性同位元素(¹⁴C)でラベルしたシュウ酸カルシウム(COM)結晶を暴露し、抗体投与による結晶付着能の変化を定量的、形態学的に評価した。*In vivo*実験 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、1000µg/ml)を投与、WT群、KO群には、マウスIgG(500µg/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。

4. 研究成果

(*In vitro*実験)尿細管細胞にCOM結晶を暴露すると、細胞に結晶が取り込まれ、形態は膨化し崩壊するものの、OPN抗体投与により、結晶の尿細管細胞への接着、細胞の崩壊が抑制された。(*In vivo*実験)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、1000µg/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を証明した。

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18件)

1. Hamamoto S, Yasui T, Okada A, Koiwa S, Taguchi K, Itoh Y, Kawai N, Hashimoto Y, Tozawa K, Kohri K. Efficacy of Endoscopic Combined Intrarenal Surgery in the Prone Split-Leg Position for Staghorn Calculi. J Endourol, 29: 19-24, 2014. doi: 10.1089/end.2014.0372. (査読あり)
2. Hamamoto S, Yasui T, Okada A, Takeuchi M, Taguchi K, Shibamoto Y, Iwase Y, Kawai N, Tozawa K, Kohri K. Developments in the Technique of Endoscopic Combined Intrarenal Surgery in the Prone Split-leg Position. Urology 84: 565-570, 2014. doi:10.1016/j.urology.2014.04.020. (査読あり)
3. Isero T, Hamamoto S, Koiwa S, Kamiya H, Hashimoto Y, Yasui T, Iwase Y, Kohri K. Combined endoscopic surgery in the prone-split leg position for successful single-session removal of an encrusted ureteral stent: a case report. J Med Case Rep 8:128. 2014. doi: 10.1186/1752-1947-8-128. (査読あり)
4. Taguchi K, Okada A, Kitamura H, Yasui T, Naiki T, Hamamoto S, Ando R, Mizuno K, Kawai N, Tozawa K, Asano K, Tanaka M, Miyoshi I, Kohri K. Colony-stimulating factor-1 signaling suppresses renal crystal formation. J Am Soc Nephrol

- 25:1680-97,2014.doi:10.1016/j.juro.2014.01.013. (査読あり)
5. Zuo L, Tozawa K, Okada A, Yasui T, Taguchi K, Ito Y, Hirose Y, Fujii Y, Niimi K, Hamamoto S, Ando R, Itoh Y, Zou J, Kohri K. A Paracrine Mechanism Involving Renal Tubular Cells, Adipocytes and Macrophages Promotes Kidney Stone Formation in a Simulated Metabolic Syndrome Environment. *J Urol.* 191:1906-12,2014.doi:10.1016/j.juro.2014.01.013. (査読あり)
 6. Yasui T, Kobayashi T, Okada A, Hamamoto S, Hirose M, Mizuno K, Kubota Y, Umemoto Y, Kawai N, Tozawa K, Gao B, Kohri K. Long-term follow-up of nephrotoxicity in rats administered both melamine and cyanuric acid. *BMC Res Notes.* 7: 87, 2014. doi: 10.1186/1756-0500-7-87. (査読あり)
 7. Ichikawa J, Okada A, Taguchi K, Fujii Y, Zuo L, Niimi K, Hamamoto S, Kubota Y, Umemoto Y, Itoh Y, Yasui T, Kawai N, Tozawa K, Kohri K Increased crystal-cell interaction in vitro under co-culture of renal tubular cells and adipocytes by in vitro co-culture paracrine systems simulating metabolic syndrome. *Urolithiasis* 42: 17-28, 2014. doi: 10.1007/s00240-013-0612-5. (査読あり)
 8. Yasui T, Okada A, Hamamoto S, Taguchi K, Ando R, Mizuno K, Itoh Y, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. Efficacy of retroperitoneal laparoscopic ureterolithotomy for the treatment of large proximal ureteric stones and its impact on renal function. *Springerplus.* 11:600,2013.doi:10.1186/2193-1801-2-600. (査読あり)
 9. Okada A, Yasui T, Taguchi K, Niimi K, Hirose Y, Hamamoto S, Ando R, Kubota Y, Umemoto Y, Tozawa K, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K Impact of official technical training for urologists on the efficacy of shock wave lithotripsy. *Urolithiasis.* 41: 487-492, 2013. doi: 10.1007/s00240-013-0586-3. (査読あり)
 10. Hamamoto S, Yasui T, Okada A, Taguchi K, Kawai N, Ando R, Mizuno K, Kubota Y, Kamiya H, Tozawa K, Kohri K: Endoscopic combined intrarenal surgery for large calculi: Simultaneous use of flexible ureteroscopy and mini-percutaneous nephrolithotomy overcomes the disadvantageous of percutaneous nephrolithotomy monotherapy. *J Endourol.* 28: 28-33, 2014. doi: 10.1089/end.2013.0361. (査読あり)
 11. Yasui T, Okada A, Hamamoto S, Hirose M, Ando R, Kubota Y, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K: The association between the incidence of urolithiasis and nutrition based on Japanese National Health and Nutrition Surveys. *Urolithiasis* 41:217-24.2013. doi: 10.1007/s00240-013-0567-6. (査読あり)
 12. 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 Apr 22;8(4):e61343.doi:10.1371/journal.pone.0061343. (査読あり)
 13. Hirose Y, Yasui T, Taguchi K, Fujii Y, Niimi K, Hamamoto S, Okada A, Kubota Y, Kawai N, Itoh Y, Tozawa K, Sasaki S, Kohri K: Oxygen nano-bubble water reduces calcium oxalate deposits and tubular cell injury in ethylene glycol-treated rat kidney. *Urolithiasis.* 41:279-94. 2013. doi: 10.1007/s00240-011-0400-z. (査読あり)
 14. Kohri K, Yasui T, Okada A, Hirose M, Hamamoto S, Fujii Y, Niimi K, Taguchi K: Biomolecular mechanism of urinary stone formation involving osteopontin. *Urol Res.*40:623-37.2012.doi:10.1007/s00240-012-0514-y. (査読あり)
 15. 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* 40:121-9.2012.doi:10.1007/s00240-011-0400-z. (査読あり)
 16. 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.* 52:1207-17. 2012. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.005. (査読あり)
 17. Hamamoto S, Tozawa K, Nishio H, Kawai N, Kohri K: Successful treatment of primary malignant lymphoma of the penis by organ-preserving rituximab-containing chemotherapy. *Int J Clin Oncol,* 17:181-184, 2012. doi: 10.1007/s10147-011-0273-8. (査読あり)
 18. Takeuchi M, Suzuki T, Sasaki S, Ito M, Hamamoto S, Kawai N, Kohri K, Hara M, Shibamoto: Clinicopathologic

significance of high signal intensity on diffusion-weighted MR imaging in the ureter, urethra, prostate and bone of patients with bladder cancer. Acad Radiol, 19:827-833, 2012. doi: 10.1016/j.acra.2012.01.013. (査読あり)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Hamamoto S, Yasui T, Okada A, Okuda N, Koiwa S, Taguchi K, Kamiya H, Hashimoto Y, Iwase Y, Tozawa K, Kohri K: Efficacy of endoscopic combined intrarenal surgery in the prone split-leg position for staghorn calculi. Expert in stone disease (ESD), Capetown(South Africa). 2014年12月10日-13日
2. 瀧本周造、安井孝周、岡田淳志、伊藤尊一郎、多和田俊保、奥田奈保子、安藤亮介、戸澤啓一、岩瀬豊、郡健二郎 SF-36 を用いた健康関連 QOL の解析による尿路結石碎石アルゴリズムの確立。日本尿路結石症学会、あべのハルカス(大阪府大阪市)、2014年8月29日-30日
3. 瀧本周造、岡田淳志、安藤亮介、安井孝周、岩瀬豊、戸澤啓一、郡健二郎 難治性腎結石に対する残石ゼロを目指した TUL と細径 PNL による同時治療法の確立。日本泌尿器科学会総会、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)、2014年4月24日-27日
4. Hamamoto S, Yasui T, Koiwa S, Isero T, Kamiya H, Hashimoto Y, Okada A, Taguchi K, Niimi K, Fujii Y, Yasui T, Tozawa K, Iwase Y, Kohri K. Successful results of endoscopic combined intrarenal surgery against large calculi; simultaneous use of flexible ureteroscopy and mini-percutaneous nephrolithotomy overcame the drawbacks of the monotherapy of percutaneous nephrolithotomy. American Urological Association (AUA), San Diego (USA). 2013年5月3日-5日
5. 瀧本周造、安井孝周、小岩哲、伊勢呂哲也、岡田淳志、神谷浩行、橋本良博、藤田圭治、戸澤啓一、岩瀬豊、郡健二郎 「腹臥位」による TUL と PNL の同時治療法の開発～ 3D-CT による腹臥位治療の有用性の検討～ 日本泌尿器科学会総会、札幌プリンスホテル(北海道札幌市)、2013年4月25日-28日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

瀧本 周造 (HAMAMOTO SHUZO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号 : 80551267