

令和 4 年 6 月 28 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：18K09200

研究課題名(和文) ミトコンドリアcyclophilin Dをターゲットとした尿路結石予防法の開発

研究課題名(英文) Development of urinary stone prevention method targeting mitochondrial cyclophilin D

研究代表者

伊藤 靖彦 (Ito, Yasuhiko)

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：90293430

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)： 尿路結石形成の過程において腎尿管細胞内のミトコンドリア傷害が重要な因子である。ミトコンドリア傷害はcyclophilin D (CypD)が活性化されることによって起こる。そこでCypDの活性化を抑制するcyclosporine A (CsA)をモデル動物に投与し尿路結石形成に関する評価を行った。

本研究では結石モデルラットを用いた。CsAを投与されることによりCypDの活性化が抑制され、その結果、細胞死と尿路結石形成が抑制されることが示された。本研究は実験動物におけるものであるが、実験結果からCypDの活性化を抑制する薬剤は将来的に人の尿路結石を予防できる可能性があることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の尿路結石研究では、遺伝子発現の解析や結石内蛋白の解析に注目され、尿路結石予防を目指し多くの研究がなされてきた。本研究では未だ達成できていない臨床応用される予防法や予防薬の開発を目的とした。尿路結石の形成初期における腎尿管細胞でのミトコンドリア傷害、特にcyclophilin Dに着目した点が本研究の学術的独自性であり、MPT活性化の制御で尿路結石を予防法の開発を試みる点が他のグループにはないポイントである。本研究の成果は臨床応用可能なCypD活性化を抑制する結石予防薬の開発にも直結する。

研究成果の概要(英文)： Mitochondrial damage in renal tubular cells is an important factor in the process of urinary stone formation. Mitochondrial injury is caused by the activation of cyclophilin D (CypD). Therefore, we administered cyclosporine A (CsA), which suppresses the activation of CypD to model animals and evaluated for urinary stone formation.

In this study, urinary stone model rat was used. It was shown that administration of CsA suppressed the activation of CypD, resulting in suppression of cell death and urinary stone formation. Although this study was conducted in experimental animals, the experimental results showed that drugs that suppress the activation of CypD may be able to prevent human urinary stones in the future.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：尿路結石形成 cyclophilin D ミトコンドリア cyclosporine A 結石モデル動物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

わが国の尿路結石の生涯発症率は男性で 15%、再発率は 5 年で 50%と高く、成因の究明と再発予防法の確立は急務であるが、それらに関する研究はほとんど成されていない。

私たちは尿路結石が形成される初期段階において、ミトコンドリア傷害が起点となっていることを明らかにしてきた。ミトコンドリア傷害はマトリックスタンパク質の一つである Cyclophilin D (CypD) に依存的なミトコンドリア膜透過性遷移 (mitochondrial permeability transition, MPT) が重要な役割を担っていることを解明したが、尿路結石の予防法の確立には至っていない。

### 2. 研究の目的

これまでの研究成果をふまえて、本研究では CypD 依存的な MPT を阻害することによる新しい尿路結石予防法の開発を目標とし研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### (a) CypD 活性化阻害薬による結石形成抑制効果の検討

結石形成モデルマウスに CypD 活性化阻害薬である cyclosporine A (CsA) を投与し、結石形成が抑制されるか検討し、CypD 活性化阻害薬が尿路結石の予防薬となりうるかを明らかにする。

本研究では結石モデルラットを用いた。ラットをエチレングリコール (EG) 自由飲水群と EG 自由飲水 + CsA 胃管投与群の 2 群に分けて評価した。CsA の投与量は 2.5mg/kg/day、5.0mg/kg/day、10.0mg/kg/day と 3 段階で検討した。2 週間の投与の後に腎臓を摘出した。摘出した腎組織 (腎尿細管細胞) において結石形成量やミトコンドリアの形態、各種酸化ストレスマーカー、アポトーシスマーカーの発現を観察し、その発現の程度を画像解析ソフトを用いて定量化する。また尿中シュウ酸排泄量を測定し 2 群間で比較検討する。

#### (b) ヒト検体における CypD と結石形成の関連性の検討

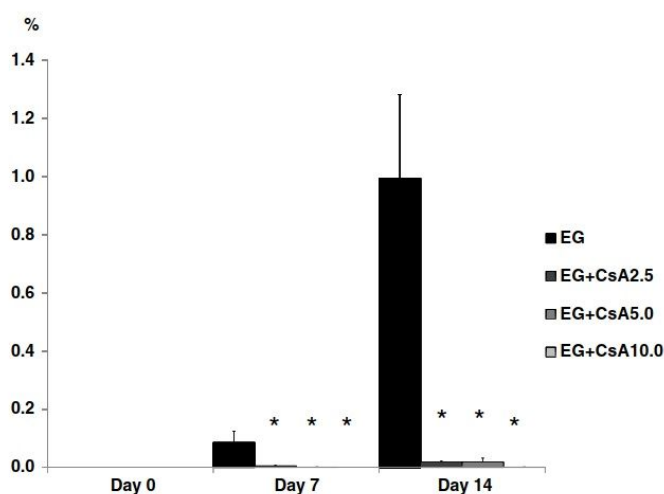
健常者と結石患者の尿中 CypD 排泄量を ELISA 法にて測定する。CypD 排泄量と尿路結石の有無、結石成分、再発率との関連を検討する。これにより CypD がヒトにおいて尿路結石形成時のバイオマーカーとなりうるかを明らかにする。

### 4. 研究成果

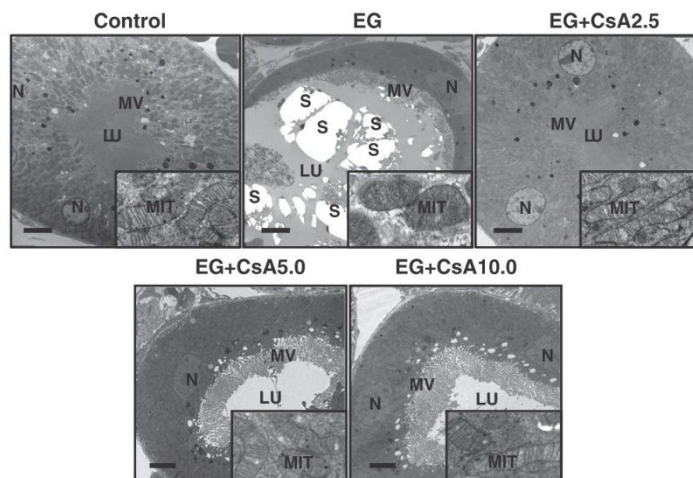
EG を投与することによりラット腎の皮髄境界部を中心に著名な結石形成を認めた。しかし CsA 胃管投与群では結石形成は抑制された。EG 自由飲水群では腎臓に多数の尿路結石形成を認めたが、CsA を投与することによってその形成量は約 10 分の 1 にまで抑制された。EG 単独群と CsA 併用群の群間において画像解析ソフトを用いて結石形成量を定量化し統計学的検討を行ったところ、統計学的優位差を認めた。

酸化ストレスマーカーである MDA (malondialdehyde)、SOD

(superoxide dismutase) に関して検討を行った。検討方法は腎組織の免疫染色ならびに画像解析ソフトを用いた定量化と統計学的検討である。EG を投与することによって腎組織に酸化ストレスの発生を高度に認めたが、CsA の投与によってその発生は有意に抑制された。結石マトリックスである OPN (osteopontin) についても同様の手法を用いて検討を行った。EG 投与群では腎組織に OPN の発現を高度に認めたが、CsA 投与群ではその発現は有意に抑制されていた。



TEM (透過型電子顕微鏡 ; transmission electron microscope) を用いてミトコンドリアの観察を行った。EG 投与によりラットのミトコンドリアの形態は二重膜構造が崩壊し、ミトコンドリア自体の膨張を認めた。しかし CsA 投与群ではそれらの形態的变化は皆無ではないが乏しかった。



尿路結石形成のメカニズムは以下の通りである。腎尿細管細胞にシュウ酸刺激などが加わることで細胞内に活性酸素の生成による酸化ストレスが生じる(シュウ酸由来の酸化ストレス)。酸化ストレスは cyclophilin D を活性化させるトリガーとされている[1]。活性化した cyclophilin D は cyclophilin D 依存的な MPT を引き起こし、ミトコンドリアは内部の二重膜が崩壊、膨張し機能が破綻する[2]。

破綻したミトコンドリアからも活性酸素・酸化ストレスが発生する(ミトコンドリア由来の酸化ストレス)。EG 投与群と CsA 投与群ではシュウ酸由来の酸化ストレスの発生に差はないが、ミトコンドリア由来の酸化ストレス発生は大きく異なってくる。

本実験で CsA 投与によって cyclophilin D 依存的な MPT を抑制することにより有意に酸化ストレスの発生が抑制されることから、尿路結石形成に関してはシュウ酸由来の酸化ストレスよりもミトコンドリア由来の酸化ストレスの方が程度が高度でかつ重要な役割を担っていることが示唆された。

ミトコンドリア由来の酸化ストレスも同様に cyclophilin D 活性化のトリガーとなるため、他の細胞の cyclophilin D 依存的な MPT を引き起こす。このようなサイクルでもって、腎組織内のミトコンドリア障害が増幅され、腎尿細管細胞障害へと至る。腎尿細管細胞が障害されることによって尿路結石形成が成される。

炎症は cyclophilin D 依存的な MPT に依存していない。このことはシュウ酸刺激によって腎細胞内に炎症が生じたのであり、cyclophilin D 依存的な MPT によって炎症が生じるものではないことを示唆している。また CsA 群であっても結石形成が全くされない訳ではなく、少量の結石が形成されることは、cyclophilin D 依存的な MPT によらない結石形成メカニズムの存在を示唆しており、炎症がその経路であると考えられた。

モデルラットにおいて、CsA を投与されることにより CypD の活性化が抑制され、その結果、腎尿細管細胞内の酸化ストレス発生も抑制され、最終的には細胞死と尿路結石形成も抑制されることが示された。本研究は実験動物におけるものであるが、実験結果から CypD の活性化を抑制する薬剤は将来的に人の尿路結石を予防できる可能性があることが示されたと考える。

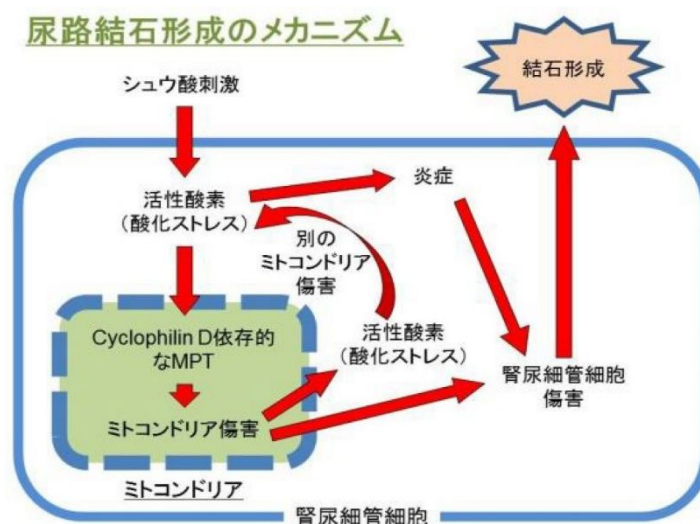
次にヒトの尿検体を用いて CypD がバイオマーカーとなり得るかの検討を行った。尿路結石症を有する群と有しない群とで、尿中 CypD に差があるか検討を行ったが、有意差は認めなかった。

#### <引用文献>

[1] Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca<sup>2+</sup> exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mic. John W. Elrode et al. J Clin Invest. 2010 Oct;120(10):3680-7.

[2] シクロフィリン D に依存したネクローシス、辻本賀英、医学のあゆみ、Volume 246, Issue 5, 369-375(2013).

### 尿路結石形成のメカニズム



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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)	

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