

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19591873

研究課題名 (和文) トロンビン受容体阻害による尿路結石症発生抑制

研究課題名 (英文) The Role of thrombin receptor on urinary stone

研究代表者

鈴木 孝治 (SUZUKI KOJI)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：70064615

研究成果の概要 (和文)：本研究では Thrombin receptor である Protease-activated receptor (PAR) の腎での遺伝子発現と尿酸負荷によるシグナル伝達を解析した。ヒト腎尿細管培養細胞 HK-2 細胞において遺伝子およびタンパクレベルでの PAR 発現を確認した。酸刺激による PAR1, 2, 3, 4 遺伝子発現の up regulation を明らかにした。また、尿酸負荷による細胞内カルシウムイオン変動と Interleukin 6 の産生から PAR を介したシグナル伝達を解明した。

研究成果の概要 (英文)：We evaluated the expression of mRNA and protein of Protease-activated receptor (PAR) as thrombin receptor in renal epithelial cells, and whether or not oxalate initiate signal transduction via this pathway. Gene and protein expression was clearly shown in HK-2 cells, which originated human tubular epithelium by PCR and Western blotting. Oxalate exposure caused up-regulation of intra-cellular calcium ion and Interleukin 6 production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：(1) Thrombin (2) Protease-activated receptor (PAR) (3) Urolithiasis
(4) Calcium oxalate

1. 研究開始当初の背景

尿路結石症は結晶核形成・成長・凝集

にいたるカスケードに遺伝子から環境
までの多因子が複雑に絡み形成される

疾患である。尿中高分子物質が形成促進・阻止に密接に関与することが知られており、これらに対する分子生物学的アプローチが発生病序解明とそれに基づくゲノム創薬を架橋する一つと考えられている。

我々はRenal Prothrombin Fragment-1(RPTF-1)分離・同定その結晶成長・凝集阻止作用を明らかとした。Protease-activated receptor(PAR)は7回膜貫通型G糖タンパク受容体でThrombinにより活性化され、その細胞機能変化や細胞内カルシウムイオンシグナル伝達を惹起するが、腎での発現・機能に関する報告はなく、また、尿路結石領域でのリガンドとレセプターの相互関係の分子生物学的報告は国内外で皆無でありその解明が必要と考えた。

2. 研究の目的

本研究では Thrombin receptor である PAR の腎での遺伝子発現と機能解析を行い受容体阻害からの尿路結石症発生抑制を明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト腎尿細管培養細胞 HK-2 細胞を用い蔘酸カルシウム結晶刺激前後で Total RNA を回収、バイオアナライザーにて RNA の quality と quantity を統一後、PRISM7700 による real time RT-PCR で PAR 遺伝子発現を定量する。

(2) Western blot 法による PAR1, 2 のタンパク発現の解析

(3) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫蛍光染色による PAR の局在の検証

(4) 蛍光 probe として fura-2/AM を使用し細胞内 Ca イオン濃度の変化を AQUA COSMOS にて解析する。

(5) ELISA による Interleukin 6 (IL-6) 定量

4. 研究成果

(1) ヒト腎尿細管培養細胞 HK-2 細胞を用いた PCR では PAR1, 2, 3, 4 すべての subtype の遺伝子発現を確認した。

また、PRISM7700 による real time RT-PCR による解析では蔘酸刺激 (蔘酸濃度 0.1 ~ 0.8mM) による PAR1, 2, 3, 4 遺伝子発現の up regulation を検証した。

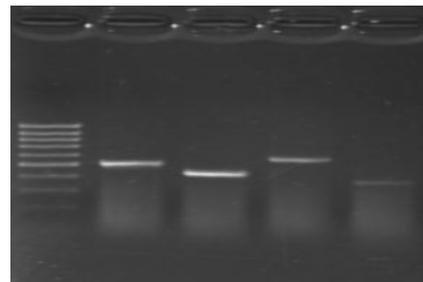


図1 PCR での PAR1, 2, 3, 4 遺伝子発現

(2) Western blot では PAR1, 2 のタンパク発現を確認した。

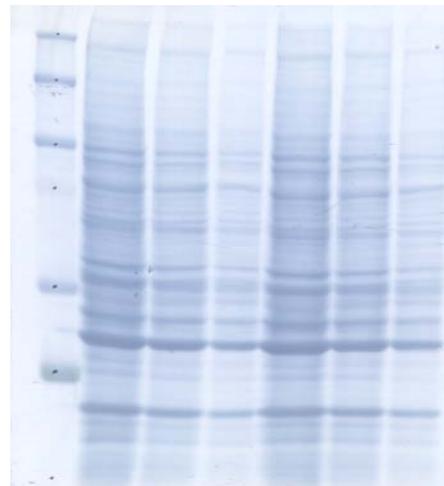


図2 Western blot での蛋白発現

(3) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫蛍光染色では HK-2 細胞の細胞膜およびゴルジ小体に陽性所見を認めた。

ヒト腎組織での免疫組織染色では近位および遠位尿細管に陽性所見を認め培養細胞での結果を反映する所見を確認した。

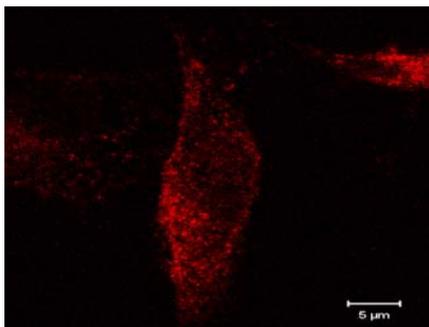


図3 免疫蛍光染色

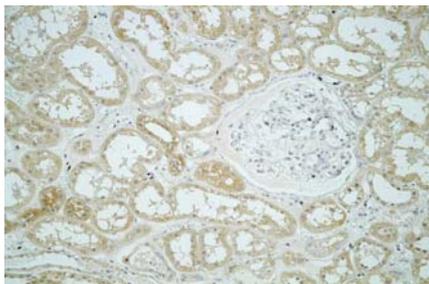


図4 免疫組織染色

(4) AQUA COSMOS による細胞内 Ca イオン濃度の解析では α -thrombin 添加により HK-2 細胞内カルシウムイオンの変動を認めた。

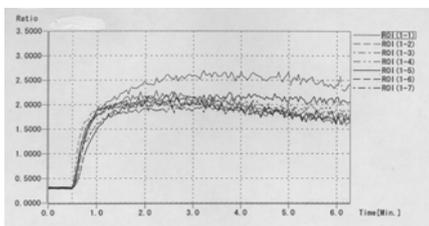


図5 細胞内カルシウムイオン濃度

(5) 蔞酸負荷(蔞酸濃度 0.1~0.4mM)によって IL-6 の産生が認められた。

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7件)

① Miyazawa K, Aihara K, Ikeda R, Moriyama MT, Suzuki K. cDNA macroarray analysis of genes in renal epithelial cells exposed to calcium oxalate crystals. Urol Res. 査読有 37. 27-33. 2009

② Moriyama MT, Suga K, Miyazawa K, Tanaka T, Higashioka M, Noda K, Oka M, Tanaka M, Suzuki K. Inhibitions of urinary oxidative stress and renal calcium level by an extract of Quercus salicina Blume/Quercus stenophylla Makino in a rat calcium oxalate urolithiasis model. Int J Urol. 査読有 16. 397-401. 2009

③ 宮澤克人, 飯田 如, 鈴木孝治: 尿中高分子物質から再発予防を考える. 泌尿器外科 査読無 21. 697-702. 2008

④ Moriyama MT, Miyazawa K, Noda K, Oka M, Tanaka M, Suzuki K. Reduction in oxalate-induced renal tubular epithelial cell injury by an extract from Quercus salicina Blume/Quercus stenophylla Makino. Urol Res. 査読有 35. 295-300. 2007

⑤ 宮澤克人, 鈴木孝治: ゲノム解析からのアプローチ. Pharma Medica 査読無 25. 21-24. 2007

⑥ 宮澤克人, 鈴木孝治: 尿中高分子物質, 最新医, 査読無 別冊 52: 161-166, 2007.

⑦ 宮澤克人, 鈴木孝治: 飲水による再発予防, 臨泌, 査読無 61: 477-481, 2007.

〔学会発表〕(計3件)

① 宮澤克人 尿路結石症における尿中高分子物質について 日本泌尿器科学会中部総会 2009. 10. 30 金沢

② 宮澤克人, 飯田 如, 森山 学, 鈴木孝治 日本泌尿器科学会中部総会 2009. 4. 24 横浜

③ 宮澤克人, 菅 幸大, 森山 学, 鈴木孝治 腎尿管上皮細胞における Protease-activated receptor の発現と機能について 北陸泌尿器科 Basic research meeting 2008. 2. 12 金沢

〔図書〕(計1件)

① 宮澤克人, 鈴木孝治: マイクロアレイ. 尿路結石のすべて pp. 205. 2008; 医学書院

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 孝治 (SUZUKI KOJI)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70064615

(2) 研究分担者

宮澤 克人 (MIYAZAWA KATSUHITO)
金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 60219772

森山 学 (MORIYAMA MANABU)
金沢医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50278131

(3) 連携研究者

なし