

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791124  
 研究課題名 (和文) 遺伝子組換え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の機能部位の解析  
 研究課題名 (英文) Analysis of the functional domains of osteopontin(OPN) on renal stone formation using OPN-transgenic and OPN-knockout mice  
 研究代表者 秋田 英俊 (AKITA HIDETOSHI)  
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
 研究者番号：10381782

## 研究成果の概要：

尿路結石は多段階で形成され、オステオポンチン (OPN) は結石形成時に腎尿細管で発現し、結石形成に重要である。OPN は情報伝達のリガンドとして作用する RGD 部位、カルシウム結合部位などの機能部位が重要な役割を担っている。本研究では、各機能部位を欠失させた、dominant negative トランスジェニックマウスを作成し、各部位の機能解析を行った。OPN の RGD 配列は結石形成の初期過程に、カルシウム結合部位は結石の成長に重要であることが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

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：泌尿器科学、尿路結石、オステオポンチン、遺伝子組み換え

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 尿路結石症の生涯罹患率は食文化の欧米化に伴い上昇し、我が国では100人中6人、欧米では20人にも達する国もみられ、生産年齢の男性に多く、その成因の究明と再発予防法の確立は急務である。尿路結石は90%の無機物質と数%の有機物質から構成されている。近年、有機物質が同定され、結石形成の場である腎臓において各種遺伝子が結石形成に伴

って発現することが示されている。しかし、遺伝子レベルに研究が進んでからも画期的な再発予防法は開発されていない。

(2) 近年の尿路結石研究では①細胞膜の構成成分であるフォスファチジルセリンは細胞膜の内面に存在するが、細胞損傷で尿細管細胞表面に露出し、結晶の付着を起こすこと、②ヒト腎結石の中にリン酸カルシウムの殻を作る nanobacteria の存在が報

告されたこと③尿中尿酸の暴露により尿細管細胞内で phospholipase A2 そして c-jun, egr-1, c-myc 等の情報伝達経路が存在することなど、が topic として挙げられる。これらは以前の結石研究とは結石形成過程の上で異なった時点に視点を移して注目されたが、結石形成研究を飛躍的に進めたとは言い難い。現時点で尿路結石形成機序研究はマトリクスおよび尿路結石関連遺伝子の発現と作用が中心である。

(3) 私達は尿路結石のマトリクスとしてオステオポンチン (OPN) を同定し、その作用を結石形成の各段階で以下の如く検討し、必須な物質であることを示してきた。

①尿路結石のマトリクス成分をクローニングし、塩基配列を決定し、オステオポンチン (OPN) とカルプロテクチン (CPT) を同定し (*Biochem Biophys Res Commun* 1992)、結石形成時に腎遠位尿細管細胞とその周囲の間質で強く発現することを確認した (*J Biol Chem* 268 1993)。

②OPN と CPT は共にマクロファージで産生され、マクロファージが尿酸カルシウム結晶を貪食することを証明した (*Am J Pathol* 1993)。

③結石形成は腎臓組織内の尿酸濃度が増加するとマクロファージが遊走し、IL-1、TNF 等のサイトカインが発現し、その後 OPN と CPT が発現し、最後に結石の核が形成されることを、免疫組織学的、電子顕微鏡学的に証明した。

④腎尿細管培養細胞は OPN 遺伝子を多量に発現し、尿酸 Ca 結晶と強い結合がみられることを証明した。

⑤さらに OPN の抗体あるいは OPN 内に含まれる細胞接着アミノ酸配列 (RGD) に変えて RGD 配列を用いることにより、OPN 機能を低下させると、細胞と結晶の結合能は低下することを示した。OPN が結石形成でケモカインとして作用することを示した。

⑥OPN アンチセンスを尿細管培養細胞に遺伝子導入し、OPN の発現抑制で、尿酸 Ca 結晶の尿細管細胞への接着が抑制されることを証明した (*Int J Urol* 2002)。OPN は尿中では結晶化を阻害するものの、細胞レベルでは結石形成を促進すると考えられる。

⑦尿酸前駆物質である glyoxylate の腹腔内投与で結石モデルマウスを確立し、wild type と比較することによって OPN

ノックアウト (OPN-NO) マウスでは結石形成がおくれ、偏光顕微鏡による観察で wild type では花弁状に結石が成長するのに対して、OPN-KO マウスでは砂状に成長しないことを確認した。

⑧透過型電子顕微鏡 (TEM) による結石モデルラットで、結石形成初期に尿細管細胞ミトコンドリアの微細構造が障害されていることを観察した。

(4) これらの結果から、尿細管細胞への尿酸暴露などに対して OPN は組織の保護作用や尿酸カルシウム結晶接着の抑制作用を示すものの、ある一定以上の発現があると尿酸カルシウム結晶から結石への成長を促すと推察している。

(5) オステオポンチンはアミノ酸配列から、情報伝達のリガンドとして作用する RGD 部位、カルシウム結合部位などの機能部位が知られ、それぞれが蛋白の機能に重要な役割を担っていると考えられている。本研究では尿路結石形成の主要遺伝子である OPN の機能を RGD 配列、カルシウム結合部位など各機能部位を欠失させた、dominant negative トランスジェニックマウスを用いて、各部位の機能解析を行う。また、結石形成初期における尿細管細胞内の OPN の局在について、電子顕微鏡を用いた免疫染色で観察する。

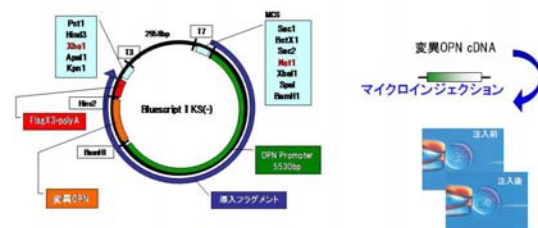
## 2. 研究の目的

尿路結石形成におけるオステオポンチン (OPN) 遺伝子の RGD 配列とカルシウム結合部位の機能を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) OPN の RGD 配列とカルシウム結合部位を変異させたトランスジェニックマウスをそれぞれ作成。

### 遺伝子導入



## 変異OPN遺伝子

### (1) Ca結合領域欠失OPN遺伝子

(2箇所Ca結合領域である、OPNcDNAの321-357塩基配列、670-705塩基配列を切断した)



### (2) 細胞接着機能不全OPN遺伝子

(アミノ酸配列がArg-Gly-Asp(RGD)からArg-Gly-Glu(RGE)へと変化するようOPNcDNAの507塩基配列をTからGへ組み替えた)



(2) Wild type マウスでは尿酸刺激や前駆物質投与により、尿管細胞で OPN が強く発現するため、変異 OPN トランスジェニックマウスでは、導入した変異 OPN の機能を解析することが困難である。このため、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た。出産後のマウスの尾より抽出した DNA を OPN-KO マウスに対する PCR と挿入遺伝子に対する PCR で遺伝子型を決定して繁殖を行っていった。

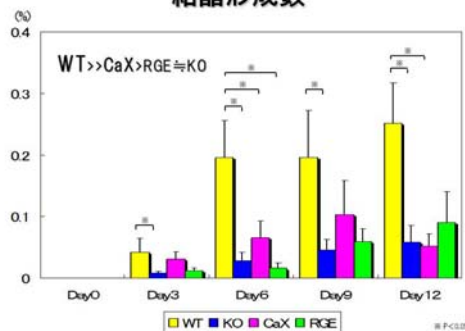


(3) 結石形成時の尿管微細構造の観察と OPN 蛋白の局在の変化について検討した。尿路結石モデルマウスとして glyoxalate 100mg/Kg を腹腔内投与し、経目的に sacrifice し、腎臓を摘出した。結石形成については、偏光顕微鏡での観察とシュウ酸カルシウム染色であるピゾラート染色で結石を同定、観察した。摘出した腎臓を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察し、結石の微細な形態を観察した。

## 4. 研究成果

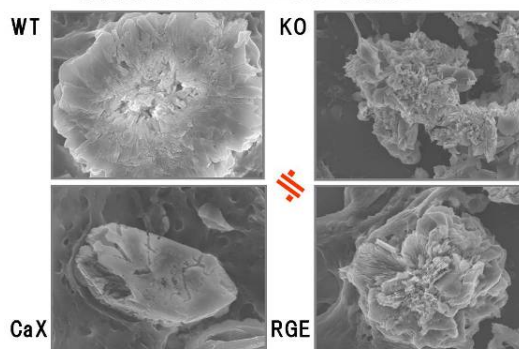
(1) OPN ノックアウトマウスでは、ワイルドタイプと比較して結石形成数が少なかった。RGD 変異マウスでもノックアウトマウスと同様に少なかった。

## 結晶形成数



(2) ノックアウトマウスでは、結晶の成長が見られなかったが、カルシウム結合部位変異マウスでも同様に成長していなかった。RGD 変異マウスでは結石の成長がワイルドタイプ同様に観察された。

## 結晶構造(走査型電子顕微鏡)



OPN の RGD 配列が結石形成の初期に、カルシウム結合部位が結石の成長に重要であることが示唆された。結石マトリックスの中心である OPN の各機能部位の役割が明らかになったことは、結石形成メカニズムの解明につながり、予防薬の開発につながると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Hamamoto S, Nomura S, Yasui T, Okada A, Hirose M, Shimizu H, Itoh Y, Tozawa K, Kohri K: Effects of impaired functional domains of osteopontin on renal crystal formation: Analyses of OPN-transgenic and OPN-knockout mice. J Bone Miner Res (accepted). 2009 May 19. [Epub ahead of print] PMID: 19453257 [PubMed - as supplied by publisher]

- ② Okada A, Nomura S, Higashibata Y, Hamamoto S, Hirose M, Itoh Y, Yasui T, Tozawa K, Kohri K: Morphological conversion of calcium oxalate crystals into stones is regulated by osteopontin in mouse kidney. J Bone Miner Res. 23: 1629-37, 2008. 査読有 [学会発表] (計2件)
- ① 浜本周造、安井孝周、岡田淳志、藤田啓治、戸澤啓一、郡健二郎: 尿路結石に関わるオステオポンチンの機能的アミノ酸配列の同定とその機能解析. 第18回泌尿器分子・細胞研究会 (鹿児島) 2009. 2. 14
- ② 安井孝周、岡田淳志、広瀬真仁、濱本周造、伊藤恭典、戸澤啓一、郡健二郎: シュウ酸前駆投与物質投与マウスから学ぶこと—尿細管細胞障害とマトリクスについて—第96回日本泌尿器科学会総会 (横浜) 2008. 4. 26

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋田 英俊 (AKITA HIDETOSHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
研究者番号: 10381782

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

安井 孝周 (YASUI TAKAHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号: 40326153

岡田 淳志 (OKADA ATSUSHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨床研究医

研究者番号: 70444966