

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09735

研究課題名（和文）酸素ナノバブル水による腎結石形成の抑制機序の解明と予防法の開発

研究課題名（英文）Study of the inhibitory mechanism of kidney stone formation and development of prevention method by oxygen nanobubble water

研究代表者

廣瀬 泰彦（Hirose, 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：60381894

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）：私たちは、結石形成モデル動物を用いて、酸素ナノバブル水の、尿路結石形成抑制効果を調べた。酸素ナノバブル水は、尿細管細胞障害、酸化ストレスを低下させ、シュウ酸カルシウム結晶の接着因子であるオステオポンチンとヒアルロン酸の腎での発現を抑制し、腎結石形成を抑制した。酸素ナノバブル水の効果を測定するために、HIFの機能評価をおこなった。マウス尿細管上皮細胞（M-1細胞）へCOM結晶を暴露させ、HIF活性化効果のある薬剤FG-4592を投与した場合と、投与しない場合で結石付着量、HIFの発現を調べた。いずれの場合も、HIFは増加したが、FG-4592投与の有無で、結石付着量に有意な違いを認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私達は、腎結石形成には、腎尿細管細胞の傷害、炎症が関与することを解明した。酸素ナノバブル水の抗炎症効果に着目し、腎結石への応用を試みるのが、本研究の特色である。酸素と水を用いて安全な飲料水を作る、日本発のナノテクノロジーである酸素ナノバブル水を用いて、結石予防法を開発しようとする発想は、独自性がある。本研究の成果は、酸素ナノバブル水の作用機序の解明につながり、腎結石のみならず、炎症が関与する他の生活習慣病への応用も期待され、応用技術の開発を促し、創造性が高い。

研究成果の概要（英文）：We investigated the inhibitory effect of oxygen nanobubble water on urinary calculi formation using calculus model animals. Oxygen nanobubble water reduced renal tubular cell damage and oxidative stress, suppressed renal expression of osteopontin and hyaluronic acid, which are adhesion factors for calcium oxalate crystals, and inhibited kidney stone formation. In order to measure the effect of oxygen nanobubble water, we performed functional evaluation of HIF. Mouse renal tubular epithelial cells (M-1 cells) were exposed to COM crystals, and the amount of calculus adhesion and HIF expression were investigated with and without administration of FG-4592, a drug that has an HIF-activating effect. In both cases, HIF increased, but there was no significant difference in the amount of calculus deposition between the administration of FG-4592 and the non-administration of FG-4592.

研究分野：尿路結石

キーワード：尿路結石 酸素ナノバブル水

## 1. 研究開始当初の背景

### 【尿路結石と動脈硬化の類似性】

尿路結石の発生頻度は急増し、日本での生涯罹患率は約 15%にもなり、5 年再発率が 40～50%と高率であることから、社会問題であり、予防法の開発が必要である。私達は尿路結石の成因に、食生活、とくに脂質代謝異常が強く関連することを以下の成果より示唆してきた。(1)尿路結石の発生は日本では戦後欧米型食生活になると共に急増し、欧米先進国でも高頻度であること、(2)尿路結石のマトリックス成分として、はじめて私達が同定したオステオポンチン(OPN)とカルプロテクチン(CPT)が、動脈石灰化にも関与していること、(3)コレステロール食負荷ラット腎でオステオポンチンの発現が増加し結石が形成されること、(4)結石形成前に動脈石灰化と同様にマクロファージとそれに係わるサイトカイン(IL 2、TNF、ICAM 1、VCAM - 1 等)が腎臓で発現すること、などが挙げられる。特に動脈硬化の血管壁石灰化機序と結石形成機序が類似していることを動物実験、分子生物学的手法により証明し、臨床上、尿路結石症患者で脂質代謝異常、動脈硬化の合併が多くみられることも上記の裏付けとなる。

私達はこれまでの研究成果より、尿路結石の形成初期には、シュウ酸等による細胞障害がオステオポンチンの発現や酸化ストレスの増強を起こし、腎間質にマクロファージが誘導され、炎症性サイトカインの発現を介して、結石原基となる結晶を貪食、泡沫化し、結石の核となる形成機序を推測している。

### 【ナノバブルの開発と特徴】

近年、微細気泡技術の一つである酸素ナノバブルが、炎症性サイトカイン(TNF $\alpha$ )刺激による血管内皮細胞からの接着分子(ICAM-1、VCAM - 1)発現と、活性化マクロファージの血管内皮細胞への接着を抑制することにより、動脈硬化を抑制することが報告された。微細気泡は、直径が 50 $\mu\text{m}$  以下になると、マイクロバブルと呼ばれ、生物化学的に特別な作用をもつ。しかし、マイクロバブルは、液体の中で上昇とともに消滅するため、不安定で、利用することができなかった。2004 年、電解質イオンを含む水の中でマイクロバブルを瞬時に圧壊させることで、ナノバブルの製造と安定化が実現した(独立行政法人 産業技術総合研究所,特願 2004-062044 号)。気泡界面に濃縮した電荷の静電的反発力と濃縮したイオン類が気泡を包み込む殻として作用していることが、ナノバブルの安定化メカニズムである。ナノバブルは直径が 1 $\mu\text{m}$ 以下の超微細な気泡であり、ナノバブル化された気体の種類により、オゾンナノバブル(特願 2004-062156 号)と酸素ナノバブル(特願 2004-026160 号)が、実用化されている。オゾンナノバブルは、微生物殺菌作用により、歯周病を改善させる効果、酸素ナノバブルは、魚介類の環境変化に対する適応性の向上、植物の成長促進など、生物に対しての活性効果が報告されている。マウスのマイクロバブル入浴ではインスリン様成長因子(IGF-1)の産生亢進がみられ、抗酸化作用、抗ストレス作用を持つことが明らかになり、2008 年には、「組織の修復又は再生用製剤」として国際特許(WO 2008/072370 A1)が取得された。酸素ナノバブルは、酸素や水を用いた技術のため、安全性が高く、医療への応用が可能と考えられ、培養細胞実験では、動脈硬化の抑制作用が報告されていることから、発生機序が類似している尿路結石の予防効果が期待できる。本研究は、酸素ナノバブルによる尿路結石の形成抑制作用とその機序を明らかにし、臨床応用を目的とする。

## 2. 研究の目的

酸素ナノバブルは、その生物学的作用機序は未解明な点が多いものの、ナノテクノロジーとして、医療分野での応用が期待されている。本研究では、酸素ナノバブルは尿路結石でも形成抑制効果が期待できると考えて、尿路結石予防効果とその機序を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

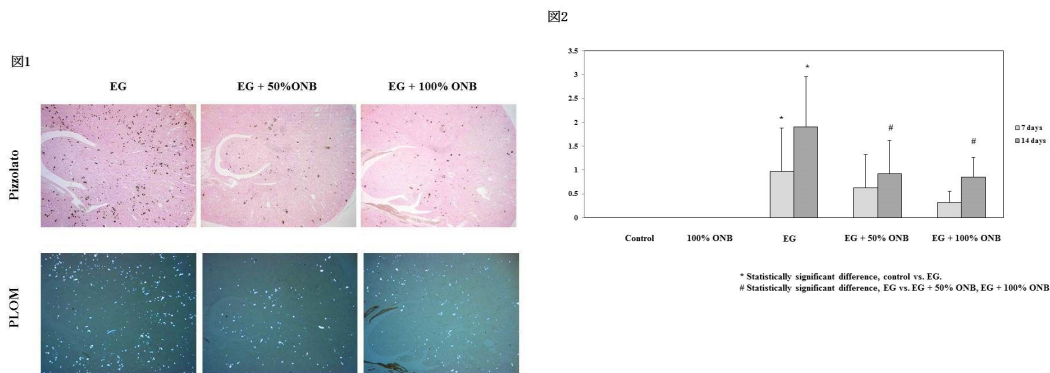
酸素ナノバブル水（アクアナノ™）を 100% ONB 水と定義し、100% ONB 水と、蒸留水を半々に混合し、50% ONB 水とした。4 週齢 Sprague Dawley (SD) ラット 60 匹を、蒸留水を自由飲水する control 群、100% ONB 水を自由飲水する 100%ONB 群、それぞれ蒸留水、50%ONB 水、100%ONB 水を自由飲水したのち、結石形成するために、7 週齢から、胃管を用いて 10% Ethylene glycol (EG) 1.2 ml を 1 日 1 回、Vitamin D<sub>3</sub> 0.5 μg を隔日、投与する EG 群、EG+50%ONB 群、EG+100%ONB 群にわけた。EG 投与 7 日間後、14 日間後に各群 6 匹ずつ、24 時間蓄尿、採血をおこない、腎を摘出した。偏光顕微鏡を用いて、腎断面の結石形成を観察し、Image-pro plus software を用いて定量した。

尿細管細胞障害マーカーとして尿中 *N*-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) 排泄を測定した。結石接着因子としてオステオポンチン、ヒアルロン酸の腎断面での発現を免疫染色し、発現面積を Image-pro plus software を用いて定量した。

#### 4. 研究成果

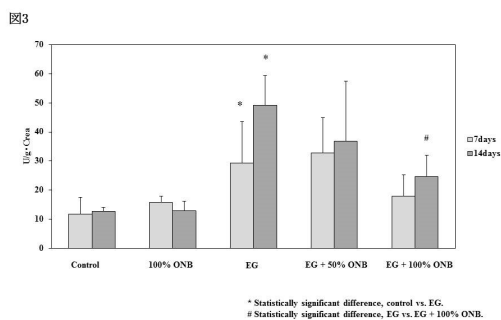
##### 【結果】酸素ナノバブル水による結石形成量の減少効果

Control 群、100% ONB 群では、腎断面に結石形成を認めなかった。(data not shown) EG 群、EG+50%ONB 群、EG+100%ONB 群では、腎全体にび慢性に結石形成がみられた。(図 1) EG 群に比べて、酸素ナノバブル水を自由飲水した EG+50%ONB 群、EG+100%ONB 群は、結石形成量の有意な減少を認めた。(図 2)



##### 【結果】酸素ナノバブル水による尿細管細胞障害の抑制効果

EG 群に比べて、EG+100%ONB 群は、近位尿細管細胞障害のマーカーである尿中 NAG 排泄は、有意な減少を認めた。(図 3)



##### 【結果】酸素ナノバブル水による結石接着因子の発現抑制効果

[OPN]  
Control 群に比べて、EG 群では、腎全体に OPN の発現がみられた。EG+50%ONB 群、EG+100%ONB 群では、OPN の発現は局限し、減弱している。(図 4) 腎皮髄境界では、OPN の発現面積は、EG 群に比べ、EG+100%ONB 群では有意に減少した。(図 5)

図4 OPN

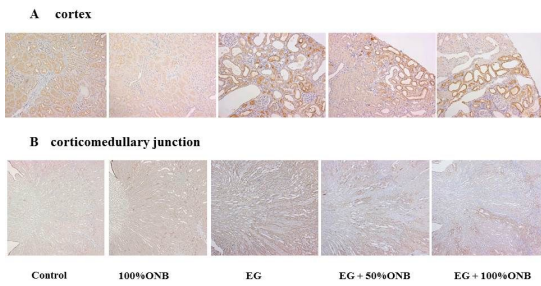
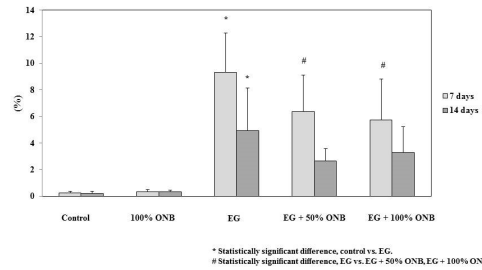


図5 腎皮髄境界におけるOPN発現面積



[HA]

Control 群では、HA は、皮質には発現せず、皮髄境界ではわずかに発現していた。Control 群に比べて、EG 群では、腎皮質、腎皮髄境界に HA の発現が強くみられた。EG+50%ONB 群、EG+100%ONB 群では、HA の発現は減弱していた。(図 6) 腎皮質における HA の発現面積は、EG 群に比べ、EG+100%ONB 群では有意に減少した。(図 7)

図6 HA

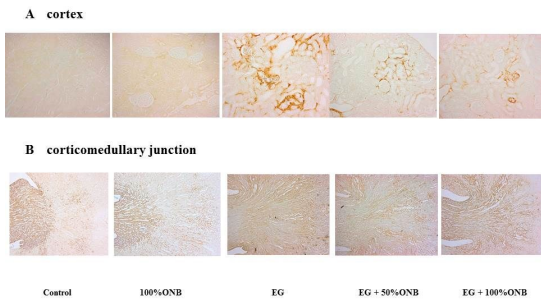
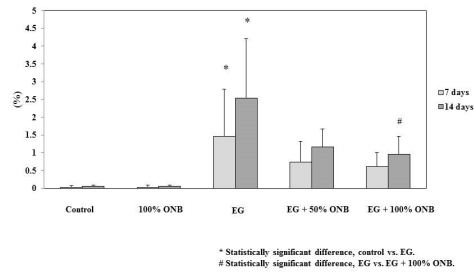


図7 腎皮質におけるHA発現面積



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 河瀬 健吾、瀧本 周造、服部 竜也、岡田 朋記、田中 勇太郎、杉野 輝明、海野 怜、田口 和己、安藤 亮介、岡田 淳志、安井 孝周
2. 発表標題 プロリン水酸化酵素阻害剤投与による腎結石抑制メカニズムの解明
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kawase Kengo, Hamamoto Shuzo, Hattori Tatsuya, Okada Tomoki, Tanaka Yutaro, Sugino Takeru, Unno Rei, Taguchi Kazumi, Ando Ryosuke, Okada Atsushi, Yasui Takahiro
2. 発表標題 THE MECHANISM OF KIDNEY STONE SUPPRESSION BY PROLINE HYDROXYLASE INHIBITOR ADMINISTRATION
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Unno Rei, Kawase Kengo, Sugino Teruaki, Tanaka Yutaro, Taguchi Kazumi, Unno Naoko, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Okada Atsushi, Nakane Akihiro, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro
2. 発表標題 Administration of antioxidants inhibits the development of renal crystals via Keap1/Nrf2 pathway
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2020(web開催) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇佐美 雅之、岡田 朋記、田中 勇太郎、杉野 輝明、海野 怜、藤井 泰普、伊藤 靖彦、田口 和己、瀧本 周造、安藤 亮介、岡田 淳志、郡 健二郎、安井 孝周
2. 発表標題 ミトコンドリア酸化防御遺伝子Nntによる腎シュウ酸カルシウム結晶形成と活性酸素種(ROS)への影響について
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

〔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	田口 和己 (Taguchi Kazumi)  (00595184)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師  (23903)	
研究分担者	郡 健二郎 (Kohri Kenjiro)  (30122047)	名古屋市立大学・その他部局等・学長  (23903)	
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	海野 怜 (Unno Rei)  (40755683)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教  (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	濱本 周造 (Hamamoto Shuzo)  (80551267)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師  (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
---------	---------