

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18569

研究課題名（和文）選択的オートファジー制御による新規尿路結石治療薬の開発

研究課題名（英文）The development of new medication for urolithiasis via autophagy

研究代表者

海野 奈央子（Unno, Naoko）

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：40836136

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）：尿路結石は、単に尿中の無機物質の増加によってできるのではなく、酸化ストレスや炎症による腎尿細管上皮細胞の傷害が結石形成を促進するという全く新しい概念のもと、細胞保護作用をもつオートファジーに着目した。傷害を受けた細胞は自己を防御するためオートファジーを誘導することが報告されており、尿路結石においてもオートファジーの細胞保護作用を亢進させることで結石形成が抑制される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿路結石の生涯罹患率は増加しており、形成機序の解明と再発予防法の確立は急務である。しかしながら、尿路結石に対する治療はその大部分を侵襲の強い外科的治療に頼っている。本研究から我々は、尿路結石の中で認められる細胞傷害に着目し、傷害を抑制することによる結石予防効果を検討したところ、細胞保護作用を示すオートファジーを活性化させることによる結石予防効果が発見され、新規治療薬となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Urolithiasis is not simply caused by an increase in inorganic substances in urine, but is based on a completely new concept that damage to renal tubular epithelial cells due to oxidative stress and inflammation promotes urinary calculi. Then we focused on autophagy having a cell-protective effect. It has been reported that injured cells induce autophagy to protect themselves, and it has been suggested that enhancing the cytoprotective effect of autophagy may suppress stone formation in urinary tract stones from this study.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：尿路結石 オートファジー 酸化ストレス 細胞傷害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

尿路結石の生涯罹患率は、食生活の欧米化に伴い上昇し男性では 100 人中 15 人に、女性では 100 人中 7 人に達している。尿路結石は多因子疾患であり、さまざまな要因が重なって発症する。尿路結石の成分の 90%以上をシュウ酸、カルシウムなどの無機物質が占め、これらが尿中で過飽和となることが結石の成因と考えられてきたが、その成因は完全には解明されていない。また尿路結石は、末期腎臓病へと進行する難治性疾患のため、予防法を含めた内科的根治治療の確立が望まれているが、未だ達成されていない。私たちは、シュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸の投与による尿路結石モデルマウスを確立し、その過程で、酸化ストレス障害・尿細管細胞傷害により結晶の凝集・沈着が亢進することを明らかにした。さらに、尿路結石の 90%を占めるシュウ酸カルシウム結石の原基であると考えられる腎盂乳頭の石灰化 (Randall's Plaque) において、結石形成が腎盂粘膜の傷害と炎症の活性化に関係していることを新たに見出した。以上のことから尿路結石は、単に尿中の無機物質の増加によってできるのではなく、酸化ストレスや炎症による腎尿細管上皮細胞の傷害が結石形成を促進するという全く新しい概念を提唱した。近年、傷害を受けた細胞は自己を防御するためオートファジーを誘導することが報告されている。オートファジーは多分野で研究が行われているが、尿路結石形成との関係に関する報告はなく、メカニズムの解明と予防法に応用可能であると考えた。

2. 研究の目的

尿路結石形成過程におけるオートファジーの働きを理解し、尿細管細胞内における傷害とオートファジーの働きを解明し、オートファジー制御による結石形成抑制治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

In vitro: マウス腎尿細管細胞に対してシュウ酸カルシウム 1 水和物結晶 $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ を添加後、0, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24 時間後に細胞を回収し、オートファジーの活性を関連蛋白 (LC3B, p62) の傾向免疫染色と Western-blot で、オートファジー flux を調べるため tandem fluorescent-tagged LC3 を細胞にトランスフェクションし、RFP:Red/GFP:Green シグナルの比で検討した。さらにオルガネラ傷害を蛍光免疫染色 (Mitotracker/TOMM20, LAMP1/Lysotracker, LGALS3/galectin-3) で検討し、細胞への結晶付着量を偏光顕微鏡で観察した。次にオートファジーの上流因子である mTOR の活性を p-p70S6K の Western blot で、TFEB 活性を核内タンパク抽出による Western-blot、GFP-TFEB のトランスフェクションで検討した。さらに、それらの標的因子であり、オートファジー活性に関与する ULK1 のリン酸化を調べた。また、オートファジー制御薬の効果の検討のため、抑制薬である 3-Methyladenine (3-MA); 5mM、促進薬である Torin1; 1 μM を使用した。

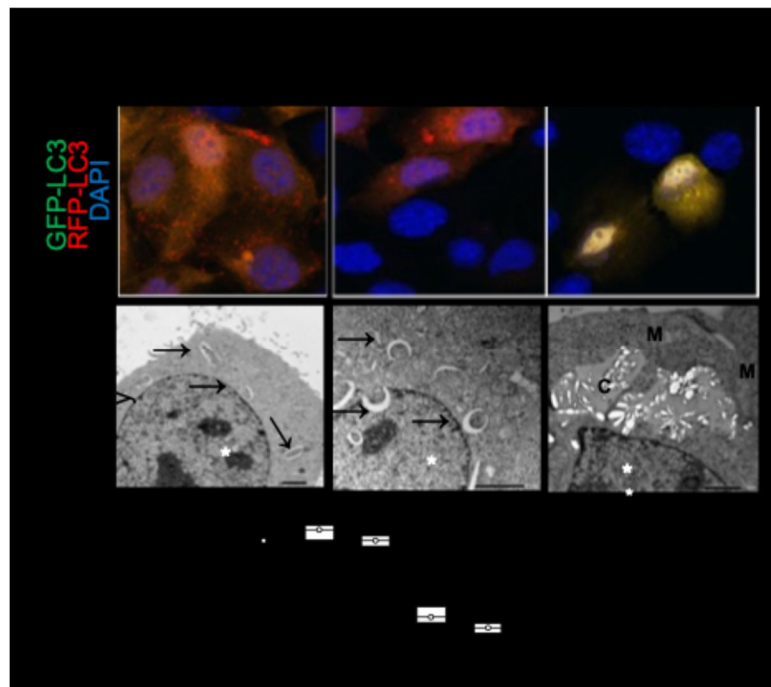
In vivo: オートファゴソームを可視化させた GFP-LC3B マウスに、シュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸 (GOX) 80mg/kg を連日腹腔内投与し、6, 12, 24 時間後、2, 4 日後に腎を摘出し、偏光顕微鏡で腎結石形成量を観察した。オートファジー活性は LC3B

の発現、p62 の Western-blot、透過型電子顕微鏡での細胞内観察で検討した。次に、mTOR、TFEB の活性を In vivo 同様に Western-blot で調べ、ULK1 のリン酸化を検討した。さらに、オートファジー促進薬である Rapamycin; 1mg/kg を連日腹腔内投与し、結石予防効果を検討した。

ヒト検体での検討: 結石患者において、腎結石の原基と考えられる腎乳頭の石灰化である Randall 's plaque を結石内視鏡治療の際に採取し、同一の結石患者において plaque 部と正常粘膜部でオートファジーの発現を p62 の免疫染色と、透過型電子顕微鏡による細胞内の観察で検討した。

4 . 研究成果

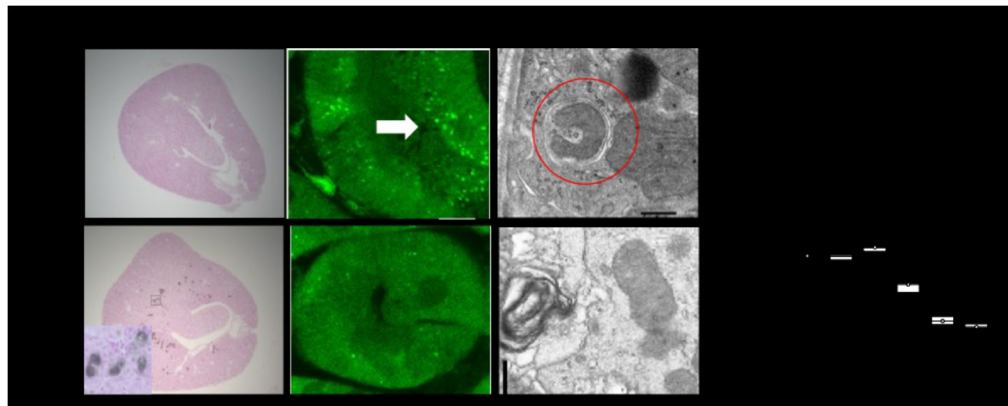
In vitro: まずはじめに、オートファジーの根拠となるオートファゴソームの観察を透過型電子顕微鏡で行った。COM を添加させる前における細胞内はミトコンドリアを中心とした正常のオルガネラを観察できた一方で、結晶添加が 24 時間を越えた細胞は、多数の傷害を受けたオルガネラを認めた。その中間となる 4-12 時間後の細胞内には傷害オルガネラを囲い込むオートファ



ゴソームを多数認めた(図)。以上のことから、通常の細胞がシュウ酸 Ca 結晶の傷害を受けると、細胞内の恒常性を維持するためにオートファジーが誘導されることがわかった。傷害オルガネラや細胞内の結晶は、結石形成の核となるため、オートファジーの活性化による結石抑制効果が考えられた。

In vivo: GOX 投与 2 日目以降で腎結石を認めた。GOX 投与早期(24 時間以内)の腎内

においてはオートファジーのマーカーとなる LC3B の発現上昇が



認められ透過型電子顕微鏡においても、傷害を受けたオルガネラを囲い込むオートファジーファゴソームが観察されたが、結石形成後では、LC3B の発現低下と、オートファジ

ー活性の低下で逆に発現が上昇する p62 の発現上昇が認められ、細胞内もオートファジー低下により傷害オルガネラや空胞が多数認められた。

In vitro, In vivo とともにその上流の活性を調べたところ、COM 添加や GOX 投与による mTOR 活性の上昇と TFEB の核内発現の低下により、ULK1 のリン酸化の阻害されたことが、オートファジー低下の原因と考えられた。Torin1 や Rapamycin の投与による mTOR 活性の阻害は、細胞内のオートファジーを活性化させ、結晶の付着や結石形成を有意に抑制した。

ヒト検体： 正常粘膜部では、細胞内にオートファゴソームを多数認めた。Plaque 部位においては、傷害オルガネラが多数認められ p62 の発現が亢進し、オートファジーが低下していることが示唆された。

本研究から、シュウ酸 Ca 結晶による mTOR/TFEB 経路の障害によるオートファジーの低下が、腎結石形成の誘因になることを見出した。本研究から、mTOR 阻害剤や TFEB 活性化薬、オートファジー活性化薬が、新規結石治療薬になる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野田 祐介、海野 奈央子、小林 大地、宇佐美 雅之、橋本 良博、岩瀬 豊
2. 発表標題 右鼠径部に生じたcellular angiofibromaの一例
3. 学会等名 第287回日本泌尿器科学会東海地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 海野 怜
2. 発表標題 Omics 解析を用いたオートファジー依存型結石抑制遺伝子の同定による新規分子標的治療薬の開発
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 海野 怜、河瀬 健吾、海野 奈央子、田中勇太郎、杉野 輝明、田口 和己、浜本 周造、安藤 亮介、中根 明宏、岡田 淳志、坂倉 毅、安井 孝周
2. 発表標題 mTOR 活性異常が腎結石形成の誘因となる
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 海野 怜、海野 奈央子、田口 和己、藤井 泰普、瀧本 周造、安藤 亮介、岡田 淳志、神谷 浩行、本間 秀樹、郡 健二郎、安井 孝周
2. 発表標題 オステオポンチン抗体により尿路結石と動脈硬化は抑制される
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 15. 海野 怜、川端 剛、海野 奈央子、田中 勇太郎、杉野 輝明、田口 和己、瀧本 周造、安藤 亮介、岡田 淳志、坂倉 毅、吉森 保、安井 孝周
2. 発表標題 mTOR/TFEBシグナル障害によるオートファジーの低下が腎尿路結石形成の誘因となる
3. 学会等名 日本尿路結石症学会第29回学術集会
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

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