

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18570

研究課題名(和文)尿中オステオポンチン糖鎖変異と関連糖転移酵素による尿路結石症診断・再発予測法

研究課題名(英文)Urolithiasis diagnosis and recurrence prediction method by urinary aberrant glycosylation of osteopontin and related glycosyltransferases

研究代表者

阿南 剛 (Anan, Go)

東北医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：70816222

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)：尿路結石形成においてオステオポンチン(OPN)は必須な糖タンパク質である。今回、私たちはOPNの糖鎖に着目した。尿路結石患者110名と健常者157名の尿中OPN濃度と尿中OPN糖鎖を検索した。尿路結石患者では健常者と比較して、尿中OPN濃度は有意に減少したにも関わらず糖鎖変異OPN(Ga13C-S-OPN)、ポリラクタミン構造をもつOPNが有意に増加していた。結石患者では、ポリラクタミン構造を有するムチン型0結合型糖鎖のOPNが増加することが示唆された。以上より、Ga13C-S-OPNは尿路結石患者で有意に増加し、尿路結石患者の尿中OPNの糖鎖構造変化が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿路結石形成に必須とされている1つがオステオポンチン(OPN)である。OPNは糖タンパク質である。これまで、尿路結石の研究分野においてOPNの糖鎖構造の変化と結石形成との関連についての研究はない。今回、私たちはOPNの糖鎖に着目した。尿路結石患者では健常者と比較して尿中OPN濃度は低下するにもかかわらず、糖鎖変異OPN(Ga13C-S-OPN)とポリラクタミンOPNが有意に増加した。以上より、尿路結石患者の尿中OPNの糖鎖構造変化が明らかとなった。この糖鎖変異OPNが結石形成にどのように関わっているのか、糖鎖変異OPNの機能解析を含めて今後検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Osteopontin (OPN) is a matrix glycoprotein of urinary calculi. This study aims to identify the role of aberrant glycosylation of OPN in urolithiasis. We retrospectively measured urinary glycosylated OPN normalized by urinary full-length-OPN (uFL-OPN) levels in 110 urolithiasis patients and 157 healthy volunteers (HVs). The uFL-OPN levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assay and glycosylated OPN was measured using a lectin array and lectin blotting.

In the study, we found that the uFL-OPN adjusted urine total protein was significantly lower in stone forming patients than in HVs ( $p < 0.001$ ) and that urinary Ga13C-S-OPN/uFL-OPN level was significantly higher in stone forming patients than in HVs ( $p < 0.001$ ). Immunoblotting and lectin blotting analysis showed that the band intensity of uFL-OPN in the HVs was higher than that of the uFL-OPN in the stone forming patients, whereas the band intensity of LEL reactive OPN clearly increased in stone forming urolithiasis patients.

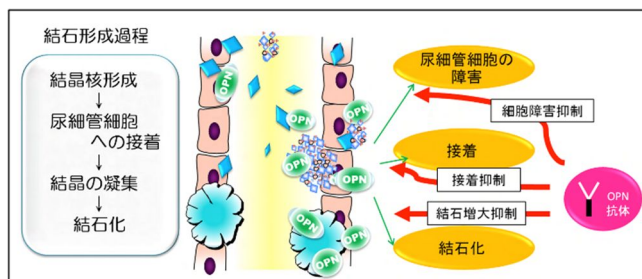
研究分野：尿路結石

キーワード：尿路結石 オステオポンチン 糖鎖生物学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 尿路結石症は、生活習慣病の一疾患であり、本邦では尿路結石罹患数が年間約 11 万人、5 年で約 45% の人が再発する罹患数の多い内分泌代謝疾患の 1 つである。尿路結石症の成因の究明と再発予防法の確立は喫緊の課題であるが、画期的な診断法、再発予防、治療薬などは開発されていない。



(2) 尿路結石形成に必須とされている 1 つがオステオポンチン (OPN) である<sup>1)</sup>。OPN はマトリックスタンパク質の 1 つで N 型糖鎖・O 型糖鎖が修飾された糖タンパク質である。OPN と尿路結石の研究は、これまで分子生物学、ゲノム解析を中心としたアプローチにより研究が進められているが、OPN が糖タンパク質であるにも関わらず、尿路結石の研究分野において OPN の糖鎖構造の変化やその糖鎖機能と結石形成との関連についての研究はない。

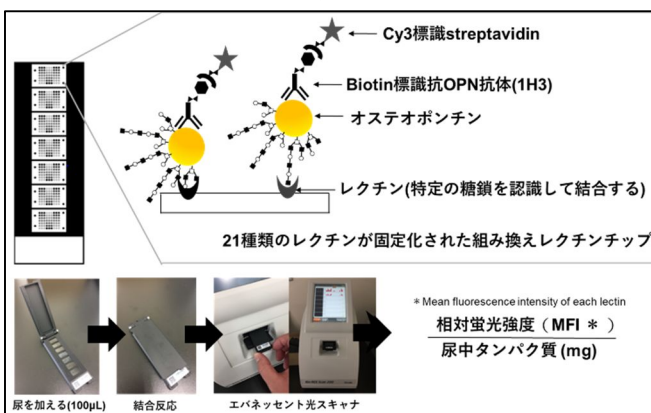
2. 研究の目的

(1) 本研究では、尿路結石患者と健常者の OPN の糖鎖変化と尿中 OPN の糖鎖変化が尿路結石形成に関連するか検討した。

3. 研究の方法

(1) 後ろ向き横断研究として、尿路結石患者 110 名と健常者 157 名の尿中 OPN 濃度を ELISA 法で測定し、尿中 OPN 糖鎖をレクチンアレイおよびレクチンプロットングにて検索した。267 名の尿検体 15mL を VIVASPIN TURBO 15 (分画分子量 3000) にて濃縮し、凍結乾燥、BCA 法でタンパク質濃度を測定した。尿中タンパク質濃度として、2 mg/mL に調製した。

尿中タンパク質濃度を調整した尿中 OPN 濃度を ELISA 法で測定し、尿中 OPN 糖鎖プロファイルレクチンアレイ(右図)、ウエスタンプロットング、レクチンプロットングで解析した。



(2) 前向き縦断研究にて、尿路結石患者 21 名の経尿道的尿管碎石術 (TUL) 前後の尿を採取し、尿中 OPN 濃度および尿中 OPN の糖鎖変異を検索した。後ろ向き研究から得られた Gal3C-S レクチン反応性 OPN 測定値より尿路結石を感度 90% で予測できる値を cut off 値とし、TUL 後残石なし群 (14 例) と TUL 後残石あり群 (7 例) に分けて経時的に比較検討した。

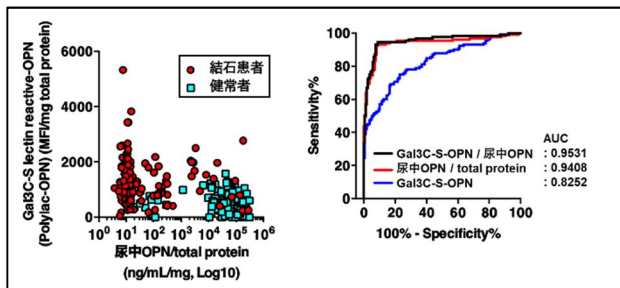
4. 研究成果

(1) 後ろ向き研究から、尿路結石患者は健常者と比べ尿中 OPN 濃度は有意に減少した ( $p < 0.001$ )。一方、レクチンアレイにて 21 種類の糖鎖変異 OPN 量を測定したが、4 種類のレクチン反応性 OPN が尿路結石群で増加を認めた。ROC 解析の結果から、尿路結石予測における AUC が最も高い、Gal3C-S レクチン反応性 OPN (Gal3C-S-OPN) に注目した。Gal3C-S レクチンの反応性から、ムチン型 O 結合型糖鎖が修飾された OPN が結石患者で増加することが示唆された。

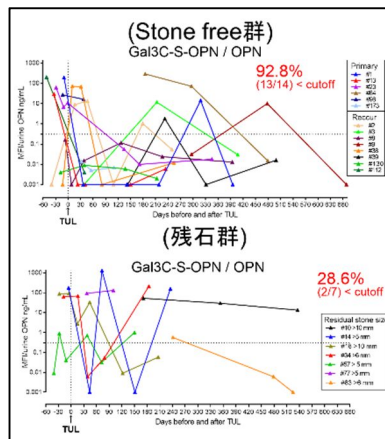
(2) さらにポリラクトサミン糖鎖を認識するトマトレクチン (LEL レクチン) によるレクチンプロットングにて、尿路結石患者では健常者と比較して、LEL レクチン反応性 OPN のバンド強度が出て増加していることを確認した。ポリラクトサミン構造は、ムチン型 O 結合型糖鎖に修飾される事がよく知られており、結石患者では、ポリラクトサミン構造を有するムチン型 O 結合型糖鎖に修飾された OPN が増加することが示唆された。

	尿路結石群		健常者 <sup>c</sup>	P value	
	初発結石 <sup>a</sup> (n=94)	再発結石 <sup>b</sup> (n=16)	(n=157)	a vs b	b vs c a vs c
性別 (男性/女性)	55 / 39	6 / 10	57 / 100	0.3553	>0.9999 0.0019
年齢 (歳)	67 (60-73)	67 (49-71)	46 (37-57)	0.9333	0.0003 <0.0001
尿中 OPN (ng/mL/mg protein) (median (IQR))	14.4 (11.1-191.1)	13.3 (9.8-93.3)	56392 (30271-115517)	>0.9999	<0.0001 <0.0001
尿中 Gal3C-S-OPN / 尿中 OPN (MFI/urine OPN) (median (IQR))	52.3 (4.7-111.6)	72.0 (21.5-144.2)	0.007 (0.003-0.020)	>0.9999	<0.0001 <0.0001

(3) Gal3C-S-OPN と OPN 濃度から尿路結石患者を感度 90%、特異度 92% (AUC0.953) で予測可能であった(右図)。(4) 前向き縦断研究から、TUL 後残石なし群(14 例)では 92.8%で結石治療後 Gal3C-S-OPN が cut off 値を下回り、TUL 後残石あり群(7 例)では 71.4%で結石治療後 Gal3C-S-OPN が cut off 値を上回った。このことから尿路結石消失とともに Gal3C-S-OPN は減少し、尿路結石残存症例では Gal3C-S-OPN が高値であることが明らかとなった(下図、右図)。



	TUL後		P value
	Stone free群 (n=14)	残石群 (n=7)	
性別 (男性/女性)	5 / 9	6 / 1	0.0635
年齢 (歳)	61 (54-70)	74 (57-77)	0.3690
尿中OPN (ng/mL/mg protein) (median (IQR))	12003 (15.5-49527)	35.6 (8.8-18322)	0.0385
尿中Gal3C-S-OPN / 尿中OPN (MFI /urine OPN) (median (IQR))	0.02 (0.001-10.2)	1.87 (0.026-88.6)	0.0030
観察期間 (日)	345 (213-407)	206 (150-525)	0.5815



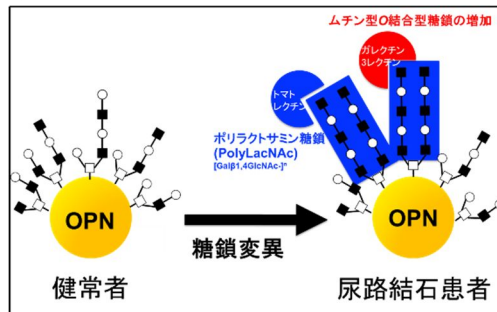
(5) 尿路結石形成過程は、結晶核形成から尿管細胞への沈着、結晶の凝集、結石化と進んでいく。この中で OPN は結晶の核になるといわれており、OPN ノックアウトマウスでは結晶までは形成するが、結晶から結石にならないことを示した報告がある<sup>2)</sup>。このことから OPN は尿路結石形成に重要なプロモーターであると考えられている。これまでも尿路結石形成患者の尿中 OPN は健康者と比較して低下することが報告されている<sup>3)</sup>。これは、OPN が結晶から結石形成の核として使用されている、つまり OPN は尿路結石形成におけるプロモーターであるという考えに基づいている。これまでに、OPN の O 型糖鎖があるものとなないもので OPN の機能を比較した研究があり、OPN 上 O 型糖鎖が OPN の細胞接着促進活性を抑制することが報告されている<sup>4)</sup>。OPN の O 型糖鎖が細胞機能に影響していることから、今回我々は、OPN の O 型糖鎖部位に着目した。

本研究から尿路結石患者の尿中の OPN 濃度は低下するにもかかわらず、糖鎖変異 OPN (Gal3C-S-OPN) が有意に増加していたのは、O 型糖鎖がついた OPN は細胞接着が弱い可能性があり、尿路結石形成の核にならずに尿中に落ちている可能性、さらに、OPN の機能の多様性に OPN 糖鎖が影響している可能性が考えられる。

(6) 研究の limitation として、後ろ向き研究において患者背景に年齢と性別差があること、前向き研究の症例数が少ないこと、尿路組織中の OPN 測定が出来ていないこと、質量解析を施行したが検体量の関係で測定できなかったことがある。

(7) 以上より、尿路結石患者では健康者と比較して、尿中 OPN 濃度は有意に減少したにも関わらず糖鎖変異 OPN (Gal3C-S-OPN) が有意に増加していた。尿路結石の有無と Gal3C-S-OPN 量が関連していることから、OPN 糖鎖変異が尿路結石診断、再発予測に関する糖鎖性バイオマーカーに成り得る可能性が示唆された。

今後さらに検討を重ね、尿中 OPN の糖鎖構造解析、Gal3C-S-OPN に関わる糖転移酵素の解析を行い、Gal3C-S-OPN が結石形成過程でどのような意義を持つのか詳細に検討する必要がある。



< 引用文献 >

- 1) Kohri K, Nomura S, Kitamura Y, et al. Structure and expression of the mRNA encoding urinary stone protein (osteopontin). J. Biol. Chem. 1993;268:15180-4.
- 2) Okada A, Nomura S, Saeki Y, et al. Morphological conversion of calcium oxalate crystals into stones is regulated by osteopontin in mouse kidney. J. Bone Miner. Res. 2008;23:1629-37.
- 3) Yasui T, Fujita K, Hayashi Y, et al. Quantification of osteopontin in the urine of healthy and stone-forming men. Urol. Res. 1999;27:225-30.
- 4) Kariya Y, Kanno M, Matsumoto-Morita K, et al. Osteopontin O-glycosylation contributes to its phosphorylation and cell-adhesion properties. Biochem. J. 2014;463:93-102.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Anan Go, Yoneyama Tohru, Noro Daisuke, Tobisawa Yuki, Hatakeyama Shingo, Sutoh Yoneyama Mihoko, Yamamoto Hayato, Imai Atsushi, Iwamura Hiromichi, Kohada Yuki, Mikami Jotaro, Ito Jun, Kaiho Yasuhiro, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Yasuhiro, Sato Makoto, Ohyama Chikara	4. 巻 21
2. 論文標題 The Impact of Glycosylation of Osteopontin on Urinary Stone Formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 93～93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21010093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 阿南 剛
2. 発表標題 尿路結石と糖鎖(オステオポンチン糖鎖変異の検索)
3. 学会等名 第108回日本泌尿器学会総会（シンポジウム）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Go Anan
2. 発表標題 Identification of aberrant glycosylation of osteopontin in urinary stone former patients as a urolithiasis biomarker
3. 学会等名 American Urological Association 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿南 剛
2. 発表標題 尿路結石形成に関する尿中糖鎖変異オステオポンチン(PolyLac-OPN)の同定
3. 学会等名 107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿南 剛
2. 発表標題 オステオポンチン糖鎖変異-PolyLacNAcオステオポンチンの結石バイオマーカーの可能性-
3. 学会等名 29回日本尿路結石症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Go Anan
2. 発表標題 Identification of aberrant glycosylation of osteopontin in urinary stone former patients as a urolithiasis biomarker
3. 学会等名 European Association of Urology 2019 (国際学会)
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
---------	---------