

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：23903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22981

研究課題名（和文）低酸素ストレスに着目した腎結石の新規予防薬の開発

研究課題名（英文）Development of a new prophylactic drug for kidney stones focused on hypoxic stress

研究代表者

河瀬 健吾（Kawase, Kengo）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・臨床研究医

研究者番号：90881772

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：腎尿管細胞(M1)に対して、control群とRoxadustat投与群にシュウ酸カルシウム結晶を添加し検討した。Roxadustat投与により結晶付着量が有意に減少し、Ccl2、Spp1の発現の減少を認めた。次に、control群とHif1 をknock downしたM1を作成し、Roxadustatを投与し同様の検討をした。Hif1 をknock downで、結石形成量は増加し、Ccl2、Spp1の増加を認めた。最後に、結石モデルマウスに対しroxadustatを投与し検討した。Roxadustat投与群で結石形成が抑制され、Ccl2、Spp1、Tnf、Emr1の発現が減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究では主にPHD阻害剤であるRoxadustatが腎結石形成に与える影響を検討した。Roxadustatは結石形成の初期段階であるシュウ酸カルシウム結晶の付着による炎症と、それに伴うマクロファージの浸潤を抑制することで結石形成が減少していることが確認できた。Roxadustatはすでに腎性貧血を対象に臨床応用されていることから、人体への投与の安全性は確立されている。そのため、今後結石患者に対しての臨床応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In renal tubular cells (M1), calcium oxalate crystals were added to the control and Roxadustat-treated groups, and the amount of crystal adhesion was significantly decreased by Roxadustat treatment, and the expression of Ccl2 and Supp1 was reduced. Next, the control group and M1 mice with knockdown of Hif1 were treated with Roxadustat, and the same study was conducted. Finally, we administered roxadustat to a mouse model of stone formation, and found that stone formation was suppressed and the expression of Ccl2, Supp1, Tnf, and Emr1 was decreased in the roxadustat-treated group.

研究分野：尿路結石症

キーワード：尿路結石 低酸素 PHD阻害剤

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腎結石の発症頻度は急増し、再発予防法の確立は緊急課題である。私たちは、腎結石の初期形成に腎尿細管細胞の傷害、酸化ストレスに伴う「炎症」が関わることを解明した。また、メタボリックシンドローム(MetS)モデルマウスを用いて腎結石形成が促進されることを発見し、「腎結石はMetSの一疾患である」とする概念を確立した。一方で、MetSの病態には組織の低酸素ストレスによる炎症が関与すると報告され、その低酸素ストレスに応答するHIF(Hypoxia-inducible factor)の活性化が注目され創薬開発されている。そこで、HIFを制御することで結石を予防できると着想し、以下の3つの研究から結石形成機序における低酸素ストレスの関与とHIFの機能解析、さらにその制御による腎結石の新規治療薬の開発を試みた。

### 2. 研究の目的

低酸素ストレスは酸化ストレスやMetSの病態との関連から、腎結石の形成と強く関係していると考えられる。そこで低酸素ストレスの腎結石形成への機能を解析し、HIFを制御することで新規治療薬の開発を目指す。

本研究では低酸素応答を促進するPHD阻害剤である(Roxadustat)が腎結石形成に与える影響を検討した。

### 3. 研究の方法

(1)研究1: 腎尿細管上皮細胞(M-1細胞)を用いた結晶付着の検討

腎尿細管細胞(M1)に対して、control群とRoxadustat(25、50、75 μM)投与群にシュウ酸カルシウム結晶 20 μg/cm<sup>2</sup>を添加し、結晶付着量、Ccl2、Sod1、Il6、Tnf、Spp1をPCRで検討した。

(2)研究2: HIF1をknock downしたM1細胞を用いた結晶付着の評価

control群とsiRNAを使用しHif1をknock downしたM1を作成し、ともにRoxadustatを投与し同様の検討を行なった。

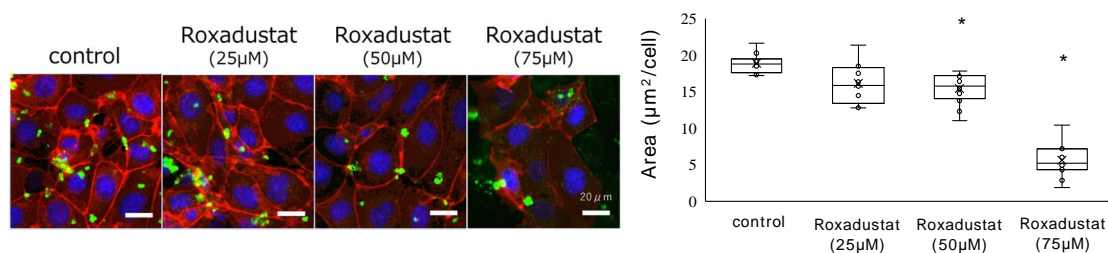
(3)研究3: 結石モデルマウスを用いた腎結石形成の観察

8週齢雄マウス(C57BL/6J)を、control群とRoxadustat投与群(5mg、10mg)の3群に分け、グリオキシル酸 80mg/kgを連日投与し、腎結石を形成させた。Day6に解剖し結石形成量、Ccl2、Sod1、Il6、Tnf、Spp1、Emr1をPCRで検討した。

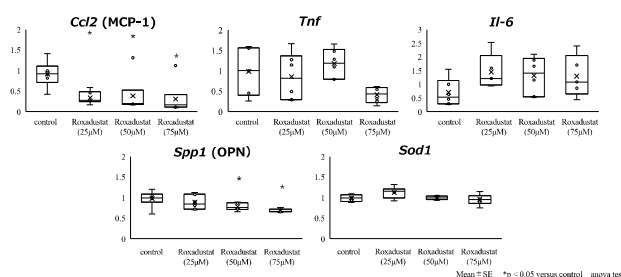
### 4. 研究成果

(1)研究1: 腎尿細管上皮細胞(M-1細胞)を用いた結晶付着の検討

InCell Analyzer 6000にて細胞骨格と核、シュウ酸カルシウム結晶を識別し、細胞に付着するシュウ酸カルシウム結晶の面積を計測した。Roxadustat投与により結晶付着量が有意に減少した(p<0.05)。

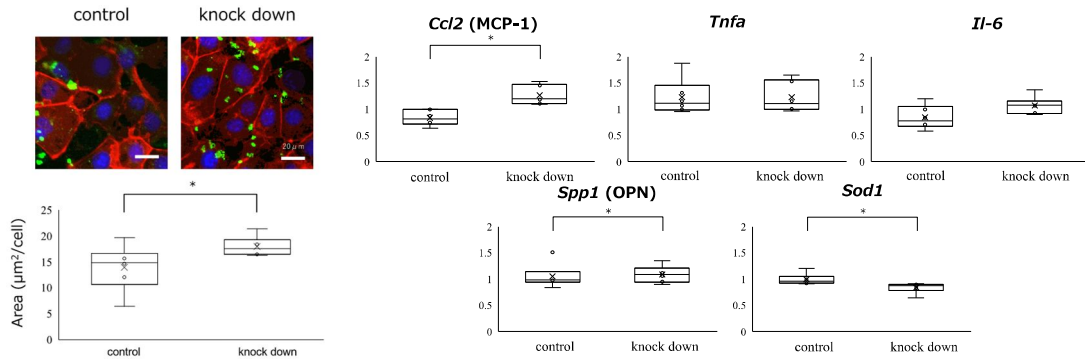


PCRによる遺伝子発現の測定ではCcl2、Spp1の発現の減少を認めた(p<0.05)。これよりRoxadustatは結晶付着とそれに伴う炎症を抑制することが分かった。

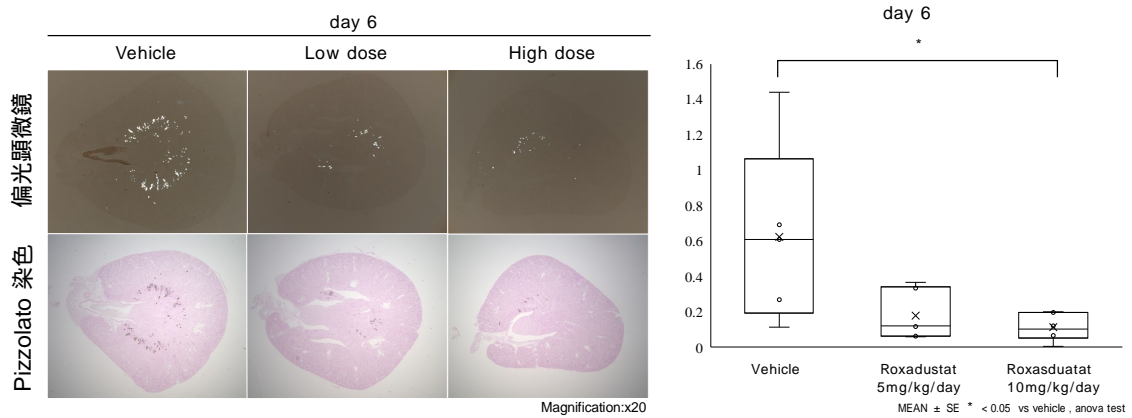


Mean ± SE \*p < 0.05 versus control, anova test

(2)研究2：HIF1 を knock down した M1 細胞を用いた結晶付着の評価  
 研究1と同様に結晶付着量を測定した。Hif1 を knock down することで、結石形成量は増加することが分かった ( $p < 0.05$ )。遺伝子発現解析では *Ccl2*、*Spp1* の増加を認められた ( $p < 0.05$ )。以上のことから、HIF1 を knock down すると研究1と反対に結晶付着が増加した。



(3)研究3：結石モデルマウスを用いた腎結石形成の観察  
 結石モデルマウスに Roxadustat を投与し検討した。Roxadustat 投与群で結石形成が低下した ( $p < 0.05$ )。 *Ccl2*、*Spp1*、*Tnf*、*Emr1* の発現が減少していた ( $p < 0.05$ )。



遺伝子発現解析では、*Ccl2*、*Spp1*、*Tnf* の発現が減少していた ( $p < 0.05$ )。この結果は研究1、2と同様の結果であったことから、結晶付着が抑制され結石形成が減少している可能性が考えられた。

以上のことから、Roxadustat は結石形成を抑制する可能性が示唆された。今後は METs との関係を検討することでより臨床応用が期待できるものになると考えられる。

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 0件）

1. 発表者名 河瀬 健吾、瀧本 周造、服部 竜也、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による腎結石形成抑制
3. 学会等名 日本尿路結石症学会第31回学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 河瀬 健吾、瀧本 周造、服部 竜也、茶谷 亮輔、岡田 朋記、田中 勇太郎、杉野 輝明、海野 怜、田口 和己、小林 隆宏、岡田 淳志、安井 孝周
2. 発表標題 プロリン水酸化酵素 (PHD) 阻害剤の抗炎症作用により腎結石形成が抑制される
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 河瀬 健吾、瀧本 周造、服部 竜也、茶屋 亮輔、岡田 朋記、田中 勇太郎、杉野 輝明、海野 怜、田口 和己、岡田 淳志、安井 孝周
2. 発表標題 PHD阻害剤の投与による腎結石形成抑制効果の検討
3. 学会等名 第70回日本泌尿器科学会中部総会 発表予定抄録
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河瀬 健吾、瀧本 周造、服部 竜也、茶屋 亮輔、岡田 朋記、田中 勇太郎、杉野 輝明、海野 怜、田口 和己、岡田 淳志、安井 孝周
2. 発表標題 PHD阻害剤の投与による腎結石形成抑制効果の検討
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020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
---------	---------