

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592076

研究課題名（和文） 遺伝子・環境因子からの尿路結石症予防の研究ーメタボリックシンドロームとの関連ー

研究課題名（英文） Research of prevention for urolithiasis considering gene and environmental factor, related metabolic syndrome.

研究代表者

藤田 圭治 (FUJITA KEIJI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：50264734

研究成果の概要（和文）：

私たちの最近の研究から、尿路結石症はメタボリックシンドロームの発症機序と似ていることがわかってきた。そこで、本研究ではその観点からみた尿路結石症予防法の確立をめざし、遺伝因子と環境因子の両面から基礎研究を行った。遺伝因子の研究として、OPN 遺伝子の SNPs 解析を行い、その結果と患者の背景・結石成分を比較し、再発リスクマーカーとなり得る SNPs を見つけ出した。環境因子の研究として、ストレス感受性シグナルである NF κ B, が増加し、ミトコンドリアが酸化ストレスにより傷害を受けたことを確認した。

研究成果の概要（英文）：

Urolithiasis looks like metabolic syndrome about mechanism of generation. Then, we performed research for establishment of prevention for urolithiasis by considering metabolic syndrome from genetic and environmental factors. In genetic research, we analyzed SNPs of the OPN gene and compared their results to patients' background and stone composition. We found the specific SNPs as a risk marker for stone recurrence. In environmental research, we found that NF κ B as a stress receptivity signal was increased and mitochondria was received injury by oxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：尿路結石症、メタボリックシンドローム、アディポサイトカイン、ストレス感受性シグナル、オステオポンチン、結石モデルマウス、OPN ノックアウトマウス、OPN トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

わが国における尿路結石の発生頻度は、第二次世界大戦後急増しており、その原因は高度経済成長に伴う食生活の欧米化やライフスタイルの変化と考えられている。上部尿路

結石の発生頻度は、2005年の尿路結石症全国調査では年間男性192人、女性79人（対人口10万比）と1965年から倍増し、生涯罹患率は男性15.1%、女性6.8%まで増加するに至っている。最近、内臓脂肪蓄積の結果、各

種の生活習慣病が集積するメタボリックシンドロームが注目され、あらためて生活習慣病への関心が高まっている。このなかで臨床的に重要な点は、動脈硬化性疾患による心血管合併症への対策である。

尿路結石症は動脈硬化症と疫学的に類似点が多く、形成機序も類似している。成因としてはそれぞれが尿酸、LDLで、形成場所がそれぞれ尿細管細胞、血管内皮細胞と異なるものの、好発年齢が中高年男性や閉経後女性で、欧米化食生活の関与、石灰化成分、形成機序としてサイトカインの発現、マクロファージの遊走、カルシウムの他に結石マトリクスであるオステオポンチン(OPN)の存在などが両者の共通点として挙げられる。私たちは、腹部大動脈の石灰化をスコア化し、健常者と比較したところ、若年男性と高齢女性で結石患者に大動脈石灰化が多くみられた。

2. 研究の目的

私たちの最近の研究から、尿路結石症はメタボリックシンドロームの発症機序と似ていることがわかってきた。そこで本研究では、その観点からみた尿路結石症予防法の確立をめざし、遺伝因子と環境因子の両面から基礎研究を行う。特にメタボリックシンドロームに關与するアディポサイトカイン・ストレス感受性シグナルの結石形成における役割を解明していくことが結石形成機序の解明と予防の手掛かりになると考えられ、尿路結石症研究の新たな道を拓くものとする。

3. 研究の方法

尿路結石形成において、OPNなどの結石関連物質の相互作用を調べる目的で、結石モデルマウス、OPNノックアウトマウス、OPN上流領域配列組み込みトランスジェニックマウスを用い、結石を形成させ、DNAマイクロアレイ解析を用い、結石形成時の発現遺伝子群と転写因子を同定し、各遺伝子の機能解析をRNA interference (RNAi)を用いて行う。

同定した結石患者に特異的なexon7にSNPsをもつOPN遺伝子を結石モデルマウスの腎尿細管細胞にOPN遺伝子導入し、OPN遺伝子の発現様式、OPN蛋白の細胞内局在、尿酸による細胞傷害作用および結石抑制効果を調べる。すでにラット腎尿細管細胞への遺伝子導入法を開発している。これらの成果をもとに遺伝子治療を、まずは結石モデルラットを用いた動物実験で開始する。遺伝子治療の効率と安全性についても確認する。

OPNのプロモーター領域で発見した結石患者に特異的なhaplotype 遺伝子をクローニングし、尿酸カルシウム結晶接着によるOPN発現のプロモーター活性を調べる。また、OPN以外の結石関連蛋白遺伝子のSNPs解析をし、SNPsの結果と患者の背景(家族歴、食生活な

ど)、結石成分を比較し、再発リスクマーカーとなり得るSNPsを見つけ出す。本研究ではこれらSNPsを用い、結石形成の危険度を予知するゲノムスクリーニング検査を開発し、ゲノム創薬に結びつける。マイクロアレイ技術を利用した全ゲノムSNP遺伝子型アッセイを用いて結石患者の遺伝子型判定を全遺伝子レベルで可能にする。

4. 研究成果

従来までの尿路結石の研究は、主に無機成分の観点から行われてきたが、私たちは遺伝子および蛋白の見地から行うことにより、結石形成機序を細胞レベルで解明してきた。尿路結石マトリクス成分のひとつとしてOPNを同定し、結石形成の分子機構を解明してきた。その結果、従来までの「無機物質が過飽和になると尿路結石ができる」という概念を変えるとともに、OPNをはじめとする結石関連蛋白を遺伝子レベルで扱うようになった。

OPNの機能解析の目的でノックアウトマウスおよびOPNのプロモーター部位を-5.1Kb、-3.1Kb、-1.5kbでdeletionした遺伝子をプロモーターとして蛍光発色するGFP蛋白遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成した。-3.1kbまでが重要な役割を持つことを報告した。

従来までの結石形成モデル動物はラットのみであったが、モデルマウスの確立に成功した。このことから遺伝子組み換えマウスと比較することが可能となり、飛躍的に研究が進んだ。さらに*in vitro*の結石形成モデルとしてagaroseゲルを使用した三次元培養系で、細胞を用いた結石形成を確立した。この実験系は薬物投与による結石形成予防効果を確認する予備実験を大量に行うことに適していた。

メタボリックシンドロームと尿路結石症の関連を検討する目的で、結石形成モデルラットを標準飼料群とHigh Fat Dietを与える高脂肪食群の2群に分けて、8週齢より8週間各々を投与し、高脂肪食群においては中性脂肪・コレステロール・腹腔内脂肪増加を認め、腎組織所見では、高脂肪食群においてEG投与1週間で尿細管拡張と尿細管細胞管腔側に内張りするような結石形成が多く認められた。標準飼料群ではEG投与2週間でmicrolithは認めるものの内張りするような所見は認めなかった。メタボリックシンドロームでは酸化ストレスが亢進しており、結石形成機序において、ストレス感受性シグナルであるNF κ Bは増加していた。また、ミトコンドリアが酸化ストレスにより傷害を受けたことが確認できた。

本研究では、遺伝因子と環境因子の両面から尿路結石症の成因究明の研究を推し進めることにより、それらの関連性を明らかにし

つつ、尿路結石の形成機序をさらに解明し、ゲノム遺伝子レベルからの新規の診断方法、予防法、治療薬の開発を行った。

尿路結石の発生に遺伝因子と環境因子を関連させて基礎研究をし、治療・予防に結びつけようとする試みは今までになく、尿路結石研究の新たな道を拓くものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件) (1~16 全て査読有り)

1. Itoh Yasunori, Yoshimura Mugi, Niimi Kazuhiro, Usami Masayuki, Hamamoto Shuzo, Kobayashi Takahiro, Hirose Masahito, Okada Atsushi, Yasui Takahiro, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: The role of long-term loading of cholesterol in renal crystal formation. *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia*, 83:23-5, 2011
2. Itoh Yasunori, Okada Atsushi, Yasui Takahiro, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Kojima Yoshiyuki, Tozawa Keiichi, Sasaki Shoichi, Kohri Kenjiro: Efficacy of selective α 1A adrenoceptor antagonist silodosin in the medical expulsive therapy for ureteral stones. *International Journal of Urology*, 18:672-674, 2011
3. Kobayashi Takahiro, Okada Atsushi, Fujii Yasuhiro, Niimi Kazuhiro, Hamamoto Shuzo, Yasui Takahiro, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: The Mechanism of renal stone formation and renal failure induced by administration of melamine and cyanuric acid. *Urological Research*, 38:117-125, 2010
4. Hirose Masahito, Yasui Takahiro, Okada Atsushi, Hamamoto Shuzo, Shimizu Hideo, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Renal tubular epithelial cell injury and oxidative stress induce calcium oxalate crystal formation in mouse kidney. *International Journal of Urology*, 17:83-93, 2010
5. Yasui Takahiro, Itoh Yasunori, Maruyama Tetsuji, Akita Hidetoshi, Hashimoto Yoshihiro, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: The single-knot method with Lapra-Ty clips is useful for training surgeons in vesicourethral anastomosis during laparoscopic radical prostatectomy. *International Urology and Nephrology*, 41:281-285, 2009
6. Okada Atsushi, Yasui Takahiro, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Kubota Yasue, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Genome-wide analysis of genes related to kidney stone formation and elimination in the calcium oxalate nephrolithiasis model mouse: detection of stone-preventive factors and involvement of macrophage activity. *Journal of Bone and Mineral Research*, 24:908-24, 2009
7. Yasui Takahiro, Itoh Yasunori, Okada Atsushi, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Kobayashi Takahiro, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Alendronate reduces the excretion of risk factors for calcium phosphate stone formation in postmenopausal women with osteoporosis. *Urologia Internationalis*, 83:226-229, 2009
8. Kobayashi Shinya, Tomiyama Yoshitaka, Hoyano Yuji, Yamazaki Yoshinobu, Sasaki Shoichi, Kohri Kenjiro: Effects of silodosin and naftopidil on distal ureter and cardiovascular system in anesthetized dogs: Comparison of potential medications for distal ureteral stone passage. *Journal of Urology*, 183:357-361, 2009
9. Kobayashi Shinya, Tomiyama Yoshitaka, Hoyano Yuji, Yamazaki Yoshinobu, Kusama Hiroshi, Itoh Yasunori, Kubota Yasue, Kohri Kenjiro: Gene expressions and mechanical functions of α ₁-adrenoceptor subtypes in mouse ureter. *World Journal of Urology*, 27:775-780, 2009
10. Tozawa Keiichi, Hashimoto Yoshihiro, Yasui Takahiro, Itoh Yasunori, Nagata Daisuke, Akita Hidetoshi, Kawai Noriyasu, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Evaluation of operative complications related to laparoscopic radical prostatectomy. *International Journal of Urology*, 15:222-225, 2008
11. Yasui Takahiro, Iguchi Masanori, Suzuki Sadao, Kohri Kenjiro: Prevalence and epidemiological characteristics of urolithiasis in Japan: National trends between 1965 and 2005. *Urology*, 71:209-213, 2008
12. Yasui Takahiro, Itoh Yasunori, Kojima Yoshiyuki, Umamoto Yukihiro, Tozawa

- Keiichi, Sasaki Shoichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Impact of microwave tissue coagulation during laparoscopic partial nephrectomy on postoperative renal function. *International Urology and Nephrology*, 40:277-282, 2008
13. Yasui Takahiro, Suzuki Sadao, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Tokudome Shinkan, Kohri Kenjiro: Eicosapentaenoic acid has a preventive effect on the recurrence of nephrolithiasis. *Urologia Internationalis*, 81:135-138, 2008
 14. Tozawa Keiichi, Yasui Takahiro, Okada Atsushi, Hirose Masahito, Hamamoto Shuzo, Itoh Yasunori, Kohri Kenjiro: NF- κ B activation in renal tubular epithelial cells by oxalate stimulation. *International Journal of Urology*, 15:924-928, 2008
 15. Okada Atsushi, Ohshima Hiroshi, Itoh Yasunori, Yasui Takahiro, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Risk of renal stone formation induced by long-term bed rest could be decreased by premedication with bisphosphonate and increased by resistive exercise. *International Journal of Urology*, 15:630-635, 2008
 16. Yasui Takahiro, Iguchi Masanori, Suzuki Sadao, Okada Atsushi, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Prevalence and epidemiologic characteristics of lower urinary tract stones in Japan. *Urology*, 72:1001-1005, 2008
- [学会発表] (計 17 件)
1. Itoh Yasunori, Okada Atsushi, Yasui Takahiro, Taguchi Kazumi, Niimi Kazuhiko, Fujii Yasuhiro, Hirose Yasuhiko, Usami Masayuki, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Fujita Keiji, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Efficacy of a selective alpha 1A adrenoceptor antagonist as a medical exclusive therapy against ureteral stones. 1st Meeting of the EAU Section of Urolithiasis (EULIS), 2011. 9. 7-10, London(United Kingdom)
 2. Hashimoto Yoshihiro, Tozawa Keiichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Overexpression of Cdc25A, an androgen receptor coactivator, in human prostate cancer. AUA 2009 Annual Meeting, 2009. 4. 25-30, Chicago(USA)
 3. Nakane Akihiro, Hayashi Yutaro, Kurokawa Satoshi, Kamisawa Hideyuki, Imura Makoto, Mizuno Kentaro, Kato Toshiki, Kojima Yoshiyuki, Maruyama Tetsuji, Kohri Kenjiro: Satisfaction with voiding, appearance, and sexual function in adolescents after hypospadias repair during childhood. AUA 2009 Annual Meeting, 2009. 4. 25-30, Chicago(USA)
 4. Hayashi Yutaro, Kojima Yoshiyuki, Mizuno Kentaro, Kurokawa Satoshi, Nakane Akihiro, Kohri Kenjiro: Disturbance of testicular development during testicular tubule formation causes vanishing testis. AUA 2009 Annual Meeting, 2009. 4. 25-30, Chicago(USA)
 5. Mizuno Kentaro, Kojima Yoshiyuki, Kurokawa Satoshi, Iwatsuki Shoichiro, Kamisawa Hideyuki, Shibata Yasuhiro, Maruyama Tetsuji, Sasaki Shoichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Relationship between testicular location and the genetic characteristics of germ cells in cryptorchidism. AUA 2009 Annual Meeting, 2009. 4. 25-30, Chicago(USA)
 6. Mizuno Kentaro, Kojima Yoshiyuki, Kurokawa Satoshi, Iwatsuki Shoichiro, Kamisawa Hideyuki, Shibata Yasuhiro, Sasaki Shoichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Expression of the estrogen receptor alpha is decreased in the cryptorchid rat testes. AUA 2009 Annual Meeting, 2009. 4. 25-30, Chicago(USA)
 7. Kato Toshiki, Kojima Yoshiyuki, Mizuno Kentaro, Kamisawa Hideyuki, Sasaki Shoichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: The new findings of signal intensity on T2-weighted-MR imaging may enable preoperative diagnosis of vanishing testes. AUA 2009 Annual Meeting, 2009. 4. 25-30, Chicago(USA)
 8. Kojima Yoshiyuki, Sasaki Shoichi, Oda Nobuyuki, Hayase Masa, Kubota Yasue, Hayashi Yutaro, Kiniwa Mamoru, Kohri Kenjiro: Prostate growth inhibition by subtype-selective alpha1-adrenoceptor antagonist naftopidil in benign prostatic hyperplasia. AUA 2009 Annual Meeting, 2009. 4. 25-30, Chicago(USA)
 9. Yasui Takahiro, Okada Atsushi, Usami Masayuki, Hamamoto Shuzo, Kobayashi Takahiro, Hirose Masahito, Itoh

- Yasunori, Tozawa Keiichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Alendronate has a preventive effect on the recurrence of nephrolithiasis by reducing the risk factors of calcium stone. AUA 2009 Annual Meeting, 2009.4.25-30, Chicago(USA)
10. Okada Shinsuke, Kojima Yoshiyuki, Hamamoto Shuzo, Mizuno Kentaro, Kubota Yasue, Sasaki Shoichi, Tsugaya Masayuki, Kohri Kenjiro: Dietary soy isoflavone replacement improves detrusor overactivity of ovariectomized rats with alteration of connexin-43 expression in the urinary bladder. AUA 2009 Annual Meeting, 2009.4.25-30, Chicago(USA)
 11. Usami Masayuki, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Matsuda Koichi, Nakamura Yusuke, Kohri Kenjiro: Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for urolithiasis. AUA 2009 Annual Meeting, 2009.4.25-30, Chicago(USA)
 12. Okada Atsushi, Tozawa Keiichi, Niimi Kazuhiro, Hirose Yasuhiko, Kobayashi Takahiro, Usami Masayuki, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Itoh Yasunori, Yasui Takahiro, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Osteopontin has an important role in kidney stone formation and elimination via renal macrophage recruitment and activation. AUA 2009 Annual Meeting, 2009.4.25-30, Chicago(USA)
 13. Kubota Hiroki, Kubota Yasue, Umemoto Yukihiro, Kaneko Tomoyoshi, Yanai Yoshimasa, Sasaki Shoichi, Kohri Kenjiro: Cyclooxygenase-2 appears to be induced in the testes of experimental cryptorchidism in order to reduce the apoptosis of germ cells and may have a key role on protection of germ cells from heat-stress. AUA 2009 Annual Meeting, 2009.4.25-30, Chicago(USA)
 14. Naruyama Hiromichi, Hashimoto Yoshiyuki, Kohri Kenjiro: Essential role of Chk1 in S phase progression through regulation of RNR2 expression. AUA 2009 Annual Meeting, 2009.4.25-30, Chicago(USA)
 15. Itoh Yasunori, Yasui Takahiro, Okada Atsushi, Hirose Masahito, Hamamoto Shuzo, Tozawa Keiichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Effects of microgravity enhancement of oxidative

stress in human renal tubular cells. AUA 2009 Annual Meeting, 2009.4.25-30, Chicago(USA)

16. Kobayashi Takahiro, Okada Atsushi, Usami Masayuki, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Yasui Takahiro, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: The melamine stone: The mechanism of renal calculus formation from melamine exposure. AUA 2009 Annual Meeting, 2009.4.25-30, Chicago(USA)
17. Tozawa Keiichi, Yasui Takahiro, Hirose Masahito, Usami Masayuki, Hamamoto Shuzo, Hirose Yasuhiko, Okada Atsushi, Itoh Yasunori, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: The role of NF- κ B on renal stone formation. AUA 2009 Annual Meeting, 2009.4.25-30, Chicago(USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 圭治 (FUJITA KEIJI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号: 50264734

(2) 研究分担者

伊藤 恭典 (ITO YASUNORI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号: 70295068

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

戸澤 啓一 (TOZAWA KEIICHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 40264733

郡 健二郎 (KOHRI KENJIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 30122047