

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592375

研究課題名(和文) 尿路結石の初期形成における病態解明と関連遺伝子探索による予防法の開発

研究課題名(英文) Development of prophylaxis by the elucidation of the pathogenesis in the initial urinary stone formation

研究代表者

安井 孝周 (Yasui, Takahiro)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40326153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：尿路結石は、形成前の慢性の酸化ストレスが急激に亢進して形成すると推察し、次の3つの観点から尿路結石の形成機序を解明し、予防法を開発した。(1)尿路結石の初期形成時におけるミトコンドリア膜透過孔を介した酸化ストレス亢進機序を解明した。(2)肥満による慢性的な酸化ストレス発生が炎症関連因子を介して、結石形成に係わる機序を解明した。(3)ヒトゲノム遺伝子を用いて新規の尿路結石関連遺伝子を同定し、この成果を応用し、遺伝子診断法を開発を行った。

研究成果の概要(英文)：(1) Renal tubular cell injury induced by oxidative stress via mitochondrial collapse is said to be the initial step of urinary stone formation. We elucidated that mitochondrial permeability transition pore opening, which is blocked by cyclosporine A, is associated with mitochondrial collapse, oxidative stress, and activation of apoptotic pathway in the initial steps of renal calcium crystallization. New medicines for urolithiasis prevention are expected to target this mechanism. (2) The mechanism of urinary stone formation in the obesity and metabolic syndrome environment involves the progression of an inflammation and immunoresponse, including oxidative stress and adhesion reactions in renal tissues. (3) Genome-wide association studies show that 5q35.3, 7p14.3, and 13q14.1 in Japanese are associated with urolithiasis. Thus, SNP analysis would aid in the prediction of urolithiasis risk and recurrence.

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 酸化ストレス ミトコンドリア 一塩基多型 肥満 メタボリックシンドローム

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、その成因の究明と再発予防法の確立は急務である。尿路結石は90%の無機物質と数%の有機物質(マトリックス)から構成されている。近年、有機物質が同定され、結石形成の場である腎臓で各種遺伝子が発現することが明らかになった。しかし、研究が遺伝子レベルに進んでからも画期的な再発予防法は開発されていない。尿路結石は常に形成されているのではなく、生まれつきの形成されやすさ(遺伝要因)、食事、肥満、アシドーシス、飲水量などの形成されやすい環境(環境要因)に、高シュウ酸尿等の「きっかけ」が重なって形成され、発症すると考えられる。尿路結石の遺伝要因として、一塩基多型による診断法を確立し、環境要因ときっかけについて、腎尿管細胞での酸化ストレス発生機序の解明から予防法を確立することを目的とした。

2. 研究の目的

尿路結石は、尿路結石になりやすい遺伝要因を持つヒト、でしやすい環境に、きっかけが起こり形成されるという点に着目した。結石の初期形成時には、形成前の慢性的酸化ストレスが急激に亢進すると推察される。次の3つの観点から尿路結石の形成機序を解明し、診断法、予防法の開発につながる研究を行った。

(1) 尿路結石形成のきっかけとなる酸化ストレス亢進機序の解明と予防: 私たちは尿管細胞のミトコンドリア傷害が結石形成の初期段階に発生することを発見した。その機序を解明し、予防薬の開発を試みた。

(2) 尿路結石の形成前段階での慢性的酸化ストレス発生機序の解明: 尿路結石はメタボリックシンドローム(MetS)の一疾患として考えられる。MetS環境での結石形成に及ぼす影響を検討した。

(3) 網羅的探索で発見した一塩基多型による尿路結石遺伝子診断法の開発: 尿路結石の発症リスク診断法は未だ確立されていないことから、予防すべき対象患者は明確ではない。私達は、結石マトリックスの主成分であるオステオポンチンの一塩基多型(SNPs)解析を行い、尿路結石の発症リスクとなるハプロタイプを同定し、報告してきた(J Urol 2005, Kidney Int 2007)。しかし、尿路結石は多因子疾患であるので、単一遺伝子の解析だけでは、臨床応用に限界がある。そこで、ゲノムワイド関連解析(GWAS)により新たな遺伝子領域を同定し、発症リスク診断法の開発への応用を試みた。

3. 研究の方法

(1) 8週齢のSDラットをコントロール群、シュウ酸前駆物質(エチレングリコール、EG)投与により作成した結石形成群(EG群)、EGに加えて、ミトコンドリア膜透過孔活性化因

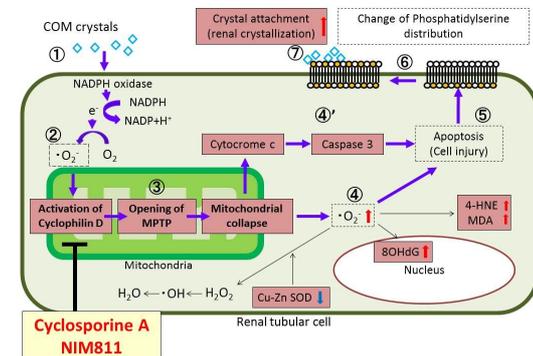
子である cyclophilin D (CypD) の抑制剤、NIM811 を投与した群(EG+NIM群)の3群で検討した。EGおよびNIM811投与後14日目に24時間尿を採取し、腎を摘出した。結石形成はPizzolato染色、偏光顕微鏡で、ミトコンドリアの形態は透過型電子顕微鏡を用いて検討した。

(2) 食欲抑制ホルモン、レプチン産生低下を呈する ob/ob と wild type に対し、シュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸(GOx)を連日腹腔内投与した。投与6日目に腎組織を摘出し、RNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行った。また、ob/obにGOxに加え、Metsに予防的に作用するアディポネクチン(APN)を投与し、結石形成を観察した。

(3) カルシウム結石患者5,892例と対照群(非結石者)17,809例を対象とした。各施設の倫理委員会の承認のもと、採血により抽出したゲノム遺伝子を解析した。GWASとして、まず全てのゲノムをカバーする195,300SNPsの塩基を決定した。1次スクリーニングでえられた、尿路結石に特徴的と考えられる上位1,000SNPsから、別の検体を用いた2次スクリーニング、replication studyとしての3次スクリーニングを行った。さらに、カルシウム結石患者601例と対照群201例を対象として発症リスクの診断を試みた。GWASで同定した遺伝子領域の中で、有意($p < 5 \times 10^{-8}$)であった7カ所のSNPsについてmultiplex PCR-Invader assayを用いてタイピングを行った。有意なSNPsについてリスクアレル(結石患者に多いアレル)の合計数と尿路結石患者の割合から発症リスクを検討した。

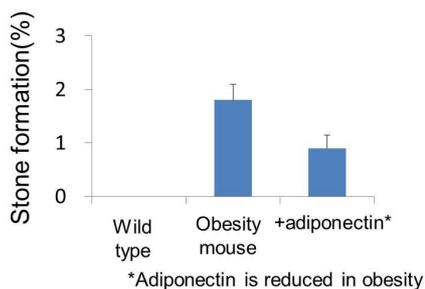
4. 研究成果

(1) 尿管細胞のミトコンドリア内に存在する cyclophilin D (CypD) が活性化することでミトコンドリア傷害が生じ、細胞傷害を介して結石形成を促進することを発見した。EG投与により結石形成がみられ、ミトコンドリアの二重膜は断裂し、内部構造は乱れ、



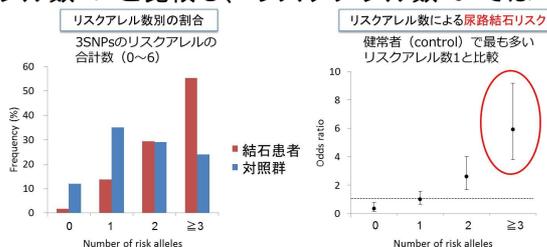
SODの発現低下、MDAの産生亢進、cleaved caspase3の発現亢進を認めた。NIMの投与により、結石形成はEG群より有意に低下し、ミトコンドリアは形態が保たれ、SODの発現亢進、MDAの産生低下、cleaved caspase3の発現低下がみられた。CypDの活性化は結石形成の促進因子となり、NIM811は尿路結石に

対する新たな治療薬になることがわかった。(2) Wild type には結石は形成されなかったが、ob/ob マウスでは腎皮髄境界部を中心に結石が形成された。マイクロアレイの Gene Ontology 解析により、結石形成時には、免疫反応、炎症反応、防御反応の発現が増加していた。また、APN 投与により、結石形成が抑制された。これらの結果から、MetS モデルマウスでは、腎組織の炎症、免疫の亢進、酸化ストレスの増加、接着因子の促進がみられ、結石形成が促進していると考えられた。また、APN 投与は抗酸化作用、抗炎症作用を介して結石形成を抑制し、新たな結石治療薬となり



うることが示唆された。

(3) GWAS によって有意であった 7 カ所の SNPs から 3 カ所の遺伝子領域 (5q35.3 [RGS14-SLC34A1-PFN3-F12], 7p14.3 [INMT-FAM188B-AQP1], 13q14.1 [DGKH]) を同定した。それぞれの遺伝子領域で尿路結石患者に有意な ($p < 7.14 \times 10^{-3}$ (0.05/7)) SNPs として、rs12654812、rs12669187、rs7981733 の 3 カ所を同定した。これらの SNPs について、リスクアレルの合計数 (0~2 × 3 カ所 = 0~6) を検討すると、尿路結石患者の発症リスクは、非結石者に最も多いリスクアレル数 1 と比較し、リスクアレル数 0 では



0.36 倍、リスクアレル数 2 では 2.59 倍、リスクアレル数 3 以上では 5.90 倍であった。今回同定した尿路結石に特徴的な遺伝子領域のうち、5q35.5 は、腎尿管細胞に発現するナトリウム - リン共輸送体 (NPT2a) , 7p14.3 は水輸送体 (AQP1) をコードすることが報告されており、その作用から結石形成に係わっていると推察される。これら遺伝子領域の SNPs 解析によるリスクアレル数で尿路結石発症リスクが診断できる可能性が示唆された。

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 13 件)

Niimi K, Yasui T, Okada A, Hirose Y, Kubota Y, Umemoto Y, Kawai N, Tozawa K, Kohri K. Novel effect of the inhibitor of mitochondrial cyclophilin D activation, N-methyl-4-isoleucine cyclosporin, on renal calcium crystallization. *Int J Urol.* (査読あり) doi: 10.1111/iju.12425. [Epub ahead of print]

Taguchi K, Okada A, Kitamura H, Yasui T, Naiki T, Hamamoto S, Ando R, Mizuno K, Kawai N, Tozawa K, Asano K, Tanaka M, Miyoshi I, Kohri K. Colony-Stimulating factor-1 signaling suppresses renal crystal formation. *J Am Soc Nephrol.* (査読あり) PMID: 24578130 [Epub ahead of print]

Zuo L, Okada A, Yasui T, Taguchi K, Ito Y, Hirose Y, Fujii Y, Niimi K, Hamamoto S, Ando R, Itoh Y, Zou J, Tozawa K, Kohri K. A paracrine mechanism involving renal tubular cells, adipocytes and macrophages promotes kidney stone formation in a simulated metabolic syndrome environment. *J Urol.* (査読あり) pii: S0022-5347(14)00024-X. doi: 10.1016/j.juro.2014.01.013. [Epub ahead of print]

Ichikawa J, Okada A, Taguchi K, Fujii Y, Zuo L, Niimi K, Hamamoto S, Kubota Y, Umemoto Y, Itoh Y, Yasui T, Kawai N, Tozawa K, Kohri K. Increased crystal-cell interaction in vitro under co-culture of renal tubular cells and adipocytes by in vitro co-culture paracrine systems simulating metabolic syndrome. *Urolithiasis.* (査読あり) 42: 17-28, 2014. doi: 10.1007/s00240-013-0612-5. Yasui T, Okada A, Urabe Y, Usami M, Mizuno K, Kubota Y, Tozawa K, Sasaki S, Higashi Y, Sato Y, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K, Kohri K. A replication study for three nephrolithiasis loci at 5q35.3, 7p14.3 and 13q14.1 in the Japanese population. *J Hum Genet.* (査読あり) 58: 588-93, 2013. doi: 10.1038/jhg.2013.59.

Yasui T, Okada A, Hamamoto S, Hirose M, Ando R, Kubota Y, Tozawa K, Hayashi Y, Gao B, Suzuki S, Kohri K. The association between the incidence of urolithiasis and nutrition based on Japanese National Health and Nutrition Surveys. *Urolithiasis.* (査読あり) 41: 217-24, 2013. doi: 10.1007/s00240-013-0567-6.

Fujii Y, Okada A, Yasui T, Niimi K, Hamamoto S, Hirose M, Kubota Y, Tozawa

K, Hayashi Y, Kohri K. Effect of adiponectin on kidney crystal formation in metabolic syndrome model mice via inhibition of inflammation and apoptosis. *PLoS One*. (査読あり) 8: e61343, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0061343.

Ando R, Nagaya T, Suzuki S, Takahashi H, Kawai M, Okada A, Yasui T, Kubota Y, Umemoto Y, Tozawa K, Kohri K. Kidney stone formation is positively associated with conventional risk factors for coronary heart disease in Japanese men. *J Urol*. (査読あり) 189: 1340-6, 2013. doi: 10.1016/j.juro.2012.11.045.

Kohri K, Yasui T, Okada A, Hirose M, Hamamoto S, Fujii Y, Niimi K, Taguchi K. Biomolecular mechanism of urinary stone formation involving osteopontin. *Urol Res*. (査読あり) 40: 623-37, 2012. doi: 10.1007/s00240-012-0514-y.

Taguchi K, Okada A, Yasui T, Kobayashi T, Ando R, Tozawa K, Kohri K. Pioglitazone, a peroxisome proliferator activated receptor agonist, decreases renal crystal deposition, oxidative stress and inflammation in hyperoxaluric rats. *J Urol*. (査読あり) 88: 1002-11, 2012. doi: 10.1016/j.juro.2012.04.103.

Niimi K, Yasui T, Hirose M, Hamamoto S, Itoh Y, Okada A, Kubota Y, Kojima Y, Tozawa K, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. Mitochondrial permeability transition pore opening induces the initial process of renal calcium crystallization. *Free Radic Biol Med*. (査読あり) 52: 1207-17, 2012. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.005.

Hirose M, Tozawa K, Okada A, Hamamoto S, Higashibata Y, Gao B, Hayashi Y, Shimizu H, Kubota Y, Yasui T, Kohri K. Role of osteopontin in early phase of renal crystal formation: immunohistochemical and microstructural comparisons with osteopontin knock-out mice. *Urol Res*. (査読あり) 40: 121-9, 2012. doi:10.1007/s00240-011-0400-z.

Hamamoto S, Yasui T, Okada A, Hirose M, Matsui Y, Kon S, Sakai F, Kojima Y, Hayashi Y, Tozawa K, Uede T, Kohri K. Crucial role of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin in renal crystal formation of mice. *J Bone Miner Res*. (査読あり) 26: 2967-77, 2011. doi: 10.1002/jbmr.495.

[学会発表](計15件)

Takahiro Yasui, Atsushi Okada, Masayuki Usami, Yasuhiko Ito, Kazumi Taguchi, Yasuhiro Fujii, Kazuhiro Niimi, Shuzo Hamamoto, Ryosuke Ando, Masahito Hirose, Yasunori Itoh, Keiichi Tozawa, Yoshikazu Higashi, Yoshikazu Sato, Koichi Matsuda, Kenjiro Kohri. Association of the loci 5q35.3, 7p14.3 and 13q14.1 with urolithiasis in the Japanese population. 2nd Meeting of the EAU Section of Urolithiasis (EULIS) (Copenhagen, Denmark) Sep. 5-7, 2013 (Sep 5)

安井孝周、岡田淳志、新美和寛、田口和己、戸澤啓一、郡健二郎. 尿路結石のゲノムワイド解析による再発リスク診断法の確立. 第56回日本腎臓学会学術総会(東京)2013.5.10-12(発表:5.11発表)

Takahiro Yasui, Atsushi Okada, Li Zuo, Yasuhiko Hirose, Kazumi Taguchi, Takahiro Kobayashi, Masahito Hirose, Ryosuke Ando, Shoichi Sasaki, Kenjiro Kohri. Association between nephrolithiasis incidence and nutrition, based on data from Japanese national surveys. 2013 (108th) Annual Meeting of American Urological Association (San Diego, California, USA) May. 4-8. 2013 (May 8)

Takahiro Yasui. Management of stone disease in the 21st century. The 8th American Urological Association and the Japanese Urological Association International Affiliate Society Meeting (San Diego, California, USA) May. 5. 2013

Takahiro Yasui, Atsushi Okada, Masayuki Usami, Shuzo Hamamoto, Ryosuke Ando, Yasunori Itoh, Shoichi Sasaki, Keiichi Tozawa, Yoshihito Higashi, Yoshikazu Sato, Kenjiro Kohri. Association of the loci 5q35.3, 7q14.3, and 13.q14.1 with urolithiasis: A case-control study in the Japanese population, involving genome-wide association study. 2013 (108th) Annual Meeting of American Urological Association (San Diego, California, USA) May. 4-8. 2013 (May 8)

安井孝周、新美和寛、浜本周造、岡田淳志、戸澤啓一、郡健二郎. 尿路結石症のリスクファクターと再発予防-薬物療法の未来と再発予防. 第101回日本泌尿器科学会総会(札幌市)2013.4.25-28(4.25発表)

安井孝周、岡田淳志、宇佐美雅之、伊藤

恭典、戸澤啓一、東義一、佐藤嘉一、郡健二郎。ゲノムワイド関連解析による尿路結石の新規遺伝子領域の同定と発症リスク診断法への応用。第101回日本泌尿器科学会総会（札幌市）2013.4.25-28（4.25発表）

Takahiro Yasui, Atsushi Okada, Kazuhiro Niimi, Shuzo Hamamoto, Takahiro Kobayashi, Masahito Hirose, Yasunori Itoh, Keiichi Tozawa, Masanori Iguchi, Kenjiro Kohri. Association between nephrolithiasis incidence and nutrition based on data from a Japanese national survey. 32nd Congress of the Societe Internationale d' Urologie (Fukuoka, Japan) Sep.30-Oct. 3, 2012 (presentation: Oct.1)

Takahiro Yasui, Atsushi Okada, Kazumi Taguchi, Yasuhiko Hirose, Yasuhiro Fujii, Kazuhiro Niimi, Masayuki Usami, Ryosuke Ando, Shuzo Hamamoto, Takahiro Kobayashi, Masahito Hirose, Yasue Kubota, Yoshiyuki Kojima, Yasunori Itoh, Shoichi Sasaki, Keiichi Tozawa, Kenjiro Kohri. Bisphosphonate prevents urolithiasis in men with osteoporosis by reducing the urinary ion activity product of calcium stone. 2012 (107th) Annual Meeting of American Urological Association (Atlanta, Georgia, USA) May. 19-23. 2012 (May 23)

安井孝周。疫学から見てくる尿路結石症の本態。第100回日本泌尿器科学会総会（横浜市）2012.4.21-24（4.24発表）

安井孝周、安藤亮介、岡田淳志、戸澤啓二、郡健二郎。診療に活用できる尿路結石症の疫学。第61回日本泌尿器科学会中部総会（京都市）2011.11.16-18（11.17発表）

Takahiro Yasui, Atsushi Okada, Jun Ichikawa, Kazumi Taguchi, Yasuhiko Hirose, Yasuhiro Fujii, Kazuhiro Niimi, Masayuki Usami, Ryosuke Ando, Shuzo Hamamoto, Takahiro Kobayashi, Masahito Hirose, Yasunori Itoh, Keiichi Tozawa, Kenjiro Kohri. Bisphosphonate prevents urolithiasis in men with osteoporosis. 1st Meeting of the EAU Section of Urolithiasis (EULIS) (London, United Kingdom) Sep. 7-10, 2011 (Sep 9)

Takahiro Yasui, Atsushi Okada, Kazumi Taguchi, Yasuhiko Hirose, Yasuhiro Fujii, Kazuhiro Niimi, Masayuki Usami, Shuzo Hamamoto, Takahiro Kobayashi, Masahito Hirose, Yasunori Itoh, Keiichi Tozawa, Yutaro Hayashi, Kenjiro Kohri. Alendronate prevent

the recurrence of urolithiasis by reducing urinary ion activity product of calcium stone. 2011 (106th) Annual Meeting of American Urological Association (Washington, D.C., USA) May. 14-19. 2011 (May 18)

Takahiro Yasui, Atsushi Okada, Kazumi Taguchi, Yasuhiko Hirose, Yasuhiro Fujii, Kazuhiro Niimi, Masayuki Usami, Ryosuke Ando, Shuzo Hamamoto, Takahiro Kobayashi, Masahito Hirose, Yasunori Itoh, Keiichi Tozawa, and Kenjiro Kohri. Association between urolithiasis and food intake based on data from a Japanese national survey. 2011 (106th) Annual Meeting of American Urological Association (Washington, D.C., USA) May. 14-19. 2011 (May 18)

Takahiro Yasui, Atsushi Okada, Kazumi Taguchi, Yasuhiro Fujii, Kazuhiro Niimi, Masayuki Usami, Shuzo Hamamoto, Takahiro Kobayashi, Masahito Hirose, Yasunori Itoh, Keiichi Tozawa, Kenjiro Kohri. Regional variations and characteristics of urolithiasis in Japan determined from a national survey. 26th Annual EAU (European Association of Urology) Congress (Vienna, Austria) March 18-22, 2011 (March 20)

〔図書〕(計2件)

安井孝周、郡健二郎。尿路結石症。（監修：吉田修，編集：岡田裕作，et al.），ベッドサイド泌尿器科学（改訂第4版），南江堂、2013、844-847

安井孝周。尿路結石の疫学・診断・治療。（編集：日本泌尿器科学会），日本泌尿器科学会 2012 年卒後教育プログラムテキスト，日本泌尿器科学会、2012、242-248

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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：4 0 3 2 6 1 5 3

(2) 研究分担者

浜本 周造 (HAMAMOTO, Shuzo)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：8 0 5 5 1 2 6 7

岡田 淳志 (OKADA, Atsushi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：7 0 4 4 4 9 6 6

戸澤 啓一 (KEIICHI, Tozawa)
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