

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791770

研究課題名(和文) 腎尿細管細胞およびミトコンドリアの障害を介した尿路結石形成機序の
解明研究課題名(英文) The elucidation of crystal formation mechanism through
the renal tubular epithelial cell injury and mitochondria injury

研究代表者

広瀬 真仁 (HIROSE MASAHITO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：70529172

研究成果の概要(和文)：本研究では、結石形成のメカニズムと女性の結石罹患率が低い理由を解明するために、酸化ストレスと細胞障害の観点から結石形成の性差について検討を行った。さらには細胞障害や酸化ストレスとの関わりを解明することで、新たな結石予防法の開発を目的とした。

2011年度における研究では、腎尿細管細胞とミトコンドリア障害からみた性差について研究した。雌雄のマウスにシュウ酸前駆物質を投与し、結石形成に至るまで、腎尿細管細胞とミトコンドリア障害について、雌雄の違いを明らかにした。結石形成モデルマウスの微細構造は、まずミトコンドリアの変形がおこり、尿細管細胞、微絨毛の崩壊、尿細管管腔内への崩壊物質の脱落、そして崩壊物質が凝集することで結晶核の形成を起こしていることが明らかになった。雌マウスでは、これらの形態変化が、雄マウスに比べて、やや遅く経過している傾向が見受けられた。

2012年度では結石関連遺伝子であるオステオポンチン(OPN)について検討を行った。雌マウスにおけるOPNの発現は、雄マウスに比べて、結石形成前の発現量が少なく、発現の増加が遅かった。ノックアウトマウスを用いた検討ではwild typeに比べて、シュウ酸前駆物質の投与後、尿細管の微細構造変化が遅く、細胞障害が少なかった。そして結石の形成量が少なかった。雌のOPNノックアウトマウスでは、雄マウスよりもさらに結石形成量が少なかった。

今回行った研究の成果はいままで明らかにならなかった尿路結石形成初期の機序を明らかにし、ミトコンドリアの係わった細胞障害、酸化ストレスの関連性、重要性を明らかにするものであり、ミトコンドリア保護を通じた新たな尿路結石予防の可能性が考えられた。そして、これらは、女性ホルモンの新たな作用のひとつである可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, to elucidate about crystal formation mechanism and the low stone prevalence of the woman, I examined sex differences of crystal formation from oxidative stress and cell injury. Besides, it was aimed for development of new stone prevention by elucidating a relation with a cell injury and the oxidation stress.

In the study in 2011, I studied sex differences judging from a renal tubule cell and a mitochondrial injury. I gave an oxalic acid precursor to male and female mice, and clarified a difference of the sex about a renal tubule cell and a mitochondrial injury. In stone model mouse, after oxalic acid precursor administration, mitochondria and microvilli of the renal tubular cell collapsed, aggregated in the renal tubular lumen, and crystal nuclei appeared. With the female mouse, these form changes passed slightly

late in comparison with a male.

In 2012, I examined osteopontin (OPN) which was a stone-related gene. The expression of OPN in the female mouse had less expression than a male before the crystal formation, and expression increasing was slow. Furthermore, a renal tubular microstructure change was slower than wild type after the treatment of the oxalic acid precursor in the examination using knockout mouse, and there were few cell disorders. And there was little quantity of crystal formation. In the female OPN knockout mouse, there was little quantity of crystals more than male.

The results of the study clarified the stone formation mechanism and the importance of mitochondrial injury and oxidative stress. Possibility of the new stone prevention through the mitochondria protection was thought. And these were thought one of the new function of the female hormone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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、女性ホルモン、酸化ストレス、細胞障害、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

わが国の 2005 年の疫学調査では、尿路結石症の生涯罹患率は、男性 15.1%、女性 6.8% で、男女比 2.5 : 1 と報告されている。女性全体では、結石罹患率は上昇しているが、若年女性に限ると罹患率は低いままで、一方、閉経後女性の罹患率は上昇している。なぜ若年女性の結石罹患率が低いのかを知ることは、結石形成のメカニズムの解明、新たな予防法の開発につながると考えられる。いままで尿路結石症に性差が見られる理由は、女性ホルモンが尿中シュウ酸排泄を減らすためと考えられていた。これは、エストロゲンがげっ歯類の肝臓で、シュウ酸の産生を抑制する酵素：SPT/AGT の形成を促すとの報告による。しかし、女性の結石患者の大部分が、高シュウ酸尿ではないため、女性の結石罹患率が低い理由は、エストロゲンのシュウ酸産生抑制効果のためだけとは考えられない。最近、私達はマウスを用いて、結石は尿中シュウ酸排泄量の増加のみでは形成されず、酸化ストレスや細胞障害が関与して形成されることを明らかにした。また、女性ホルモンは抗酸化作用を持ち、動脈硬化を予防すると報告さ

れている。このことから、女性ホルモンが酸化ストレスによる細胞障害を抑制し、尿路結石を抑制する可能性があるとして着想した。

また、私達はこれまでの研究において、尿路結石の初期形成過程で腎尿細管細胞障害がシュウ酸カルシウム結晶と培養尿細管細胞の接着を亢進することを報告した。また、その過程ではミトコンドリア障害が起こることを明らかにし、これらの現象は、抗酸化物質により抑制されることをみいだした。その成果から、結石形成には腎尿細管細胞障害が重要だと認識されている。私達はミトコンドリア障害がフリーラジカル・酸化ストレスを発生させ、細胞障害を誘起し、結石形成しやすい腎環境をつくり出すと推測した。結石形成期において、女性ホルモンが腎尿細管細胞へ引き起こす影響は知られていない。

2. 研究の目的

本研究では、結石形成のメカニズムと女性の結石罹患率が低い理由を解明するために、酸化ストレスと細胞障害の観点から結石形成の性差について検討を行う。特に、結石形成初期において、女性ホルモンが腎尿細管細胞

胞の微細構造と結石に含まれているマトリックス蛋白（結石中にはわずか数%含まれる有機物質が結石の形成に重要だと考えられるようになり、私達はその成分としてオステオポンチン（OPN）を同定した。OPNは骨基質蛋白の一つで、細胞接着に関連する RGD 部位やカルシウム接着部位をもち、動脈硬化や血管の石灰化との関係が報告されている。また、炎症や細胞障害との関与も知られている。私達は結石モデル動物を用いて、OPN が結石形成因子として必須であると報告した。いままで尿路結石形成において、OPN と女性ホルモンの関係について言及した報告はない。）に与える変化を観察する。そして、これらの結果を踏まえて、新たな結石予防法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス結石モデルを用いて尿路結石形成期における腎尿細管細胞の微細構造の形態変化を、主に透過型電子顕微鏡を用いて、経時的に詳細に検討し、性差による微細構造やミトコンドリア、細胞障害の変化について形態学的、分子生物学的に明らかにする。

詳細

グリオキシル酸 80mg/kg を 8 週齢の C57/BL6 マウス（雄、雌）に投与し、投与前、投与後、6, 12, 18, 24 時間後、2, 3, 6, 9 日後に sacrifice し、腎を摘出し、透過型電子顕微鏡を用いて、形態変化を経時的に詳細に検討する。Sacrifice 時には、麻酔下にて下大静脈から、リン酸バッファーおよび、2.5% グルタルアルデヒドを還流装置を用いて、一定速度で灌流固定を行い、腎臓を採取する。結石形成を偏光顕微鏡での観察、X線回折分析によって確認する。また、採取した腎組織を固定液の中で 1mm 角に細切り、エタノール系列で脱水し、樹脂へ置換、熱重合を行った後、マイクロトームで超薄切片（99nm）を作成し、透過型電子顕微鏡で細胞内構造の超微細形態を詳細に観察し、また、細胞障害に関連している物質（superoxide dismutase: SOD, malondialdehyde: MDA, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: 8-OHdG）の免疫組織学的検討を免疫染色法、

westernblotting 法、RT-PCR 法などを用いて経時的に検討し、ミトコンドリアの微細構造の変化、酸化ストレスの評価、その他の細胞微細構造からみた細胞障害を経時的に観察し、結石形成における性差の違いを明らかにする。また、24 時間目、2 日目、3 日目、6 日目、9 日目における 24 時間尿を採取し、シュウ酸、クエン酸、Na、K、Cl、Ca、P、Mg、Cr、PH、尿量、酸化ストレスマーカー（SOD、MDA、8-OHdG）を測定し、比較検討する。

(2) 卵巣摘除雌マウス、女性ホルモンを補充した卵巣摘除雌マウスを用いて(1)の結果が女性ホルモンによる結果であるか検証する。

詳細

麻酔下にて両側卵巣摘除を行った 8 週齢の C57/BL6 雌マウス、そして、卵巣摘除後に女性ホルモン（エストラジオール(0.01mg)+プロゲステロン(0.25mg)/週3回）を投与した 8 週齢の C57/BL6 雌マウスへ、グリオキシル酸 80mg/kg を腹腔内投与し、6, 12, 18, 24 時間後、2, 3, 6, 9 日後に sacrifice し、腎臓を摘出した。摘出は上述の検討と同様に、還流固定を行ってから摘出し、結石形成の観察、成分分析、透過型電子顕微鏡や走査型電子顕微鏡での観察、細胞障害についての免疫染色法、westernblotting 法、RT-PCR 法、そして 24 時間尿生化学および酸化ストレスマーカーの評価を行い、女性ホルモン作用について検討する。

(3) 雄、雌の OPN ノックアウトマウスを用いて、上記(1)(2)と同様の検討を行い、さらに、電子顕微鏡を用いた免疫染色法で、OPN の局在と動態を詳細に検討し、結石形成過程での OPN と女性ホルモンの関係を明らかにする。

詳細

結石モデルマウスを用いた光学顕微鏡下の免疫染色法を応用し、OPN の電子顕微鏡下での免疫染色法を確立した。Sacrifice 時に還流装置を使用して採取した腎組織を固定、脱水、樹脂へ置換、紫外線重合を行い、カプセルから取り出し、マイクロトームで超薄切片（99nm）の標本作製する。OPN モノクロー

ナル抗体を一次抗体として使用する。二次抗体は、15nmの金コロイドで標識された抗体を反応させ、透過型電子顕微鏡で腎尿細管細胞内、腎間質内、管腔内、結石内のOPNの局在を超微細形態と併せて観察する。

確立した電子顕微鏡下でのOPN免疫染色法を用いて、結石モデルマウスで投与6, 12, 18, 24時間後、2, 3, 6, 9日後の腎組織内でのOPNの局在と動態を詳細に検討する。また、腎組織中のOPNの定量的RT-PCR、in situ hybridizationを行い発現変化を確認する。さらに、OPNノックアウトマウス、トランスジェニックマウスの雄、雌（すでに作成済み）を用い、平成23年度に行ったwild typeマウスの研究と同様に電子顕微鏡を用いて、細胞障害について詳細に検討し、女性ホルモンおよびOPNの関係について明らかにする。また、他の尿路結石関連遺伝子（カルプロテクチン、プロトロンビン、バイクニン、フィブロネクチン等）の発現の時期、部位、増減についても、女性ホルモンおよびOPNの有無で雄の結石モデルマウスと比較し、女性ホルモン機能の解析を行う。

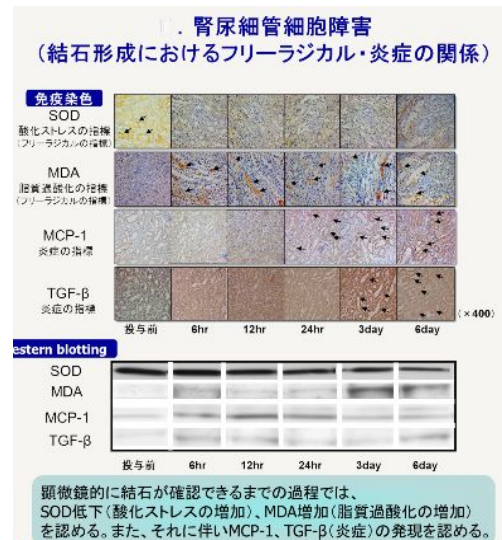
上述の検討で、結石形成において、ミトコンドリアの形態変化、酸化ストレス、細胞障害の発生が、女性ホルモンと重要な関係にあることを明らかにした上で、結石モデル動物に、女性ホルモン用の抗細胞障害物質を投与し、予防効果の検討を行う。

4. 研究成果

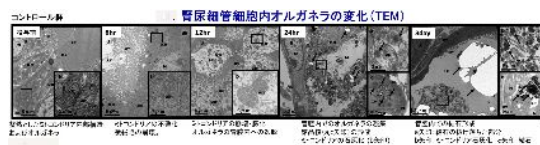
腎尿細管細胞とミトコンドリア障害からみた性差についての研究で、雌雄のマウスにシュウ酸前駆物質を投与し、結石形成に至るまで、腎尿細管細胞とミトコンドリア障害について、雌雄の違いを明らかにした。結石形成モデルマウスの微細構造は、まずミトコンドリアの変形がおり、尿細管細胞、微絨毛の崩壊、尿細管管腔内への崩壊物質の脱落、そして崩壊物質が凝集することで結晶核の形成を起こしていることが明らかになった。雌のマウスでは、これらの形態変化が、雄に比べて、やや遅く経過している傾向が認められた。

結石関連遺伝子であるオステオポンチン(OPN)についての検討では、雌マウスにお

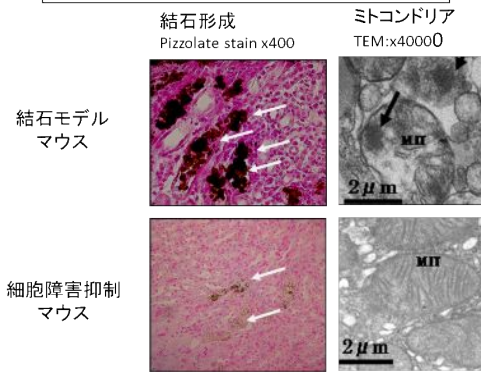
けるOPNは、雄に比べて、結石形成前の発現量が少なく、発現の増加が遅かった。さらに、ノックアウトマウスを用いて検討ではwild typeに比べて、シュウ酸前駆物質の投与後、尿細管の微細構造変化が遅く、細胞障害が少なかった。そして結石の形成量が少なかった。さらに、雌のOPNノックアウトマウスでは、雄よりもさらに結石形成量が少なかった。



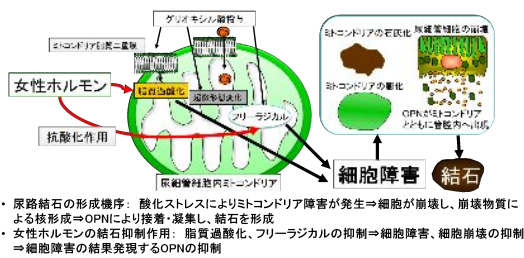
今回行った研究の成果は、いままで明らかになっていなかった尿路結石形成初期の機序を明らかにし、ミトコンドリアの係わった細胞障害、酸化ストレスの関連性、重要性を明らかにするものであり、ミトコンドリア保護を通じた新たな尿路結石予防の可能性が考えられた。そして、これらは、女性ホルモンの新たな作用のひとつである可能性が考えられた。



細胞障害抑制による結石とミトコンドリアの変化



細胞障害抑制により結石量は減少し、ミトコンドリアの形態は保持される
白矢印:結石 黒矢印:ミトコンドリア石灰化 MIT:ミトコンドリア



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 1 件)

- ① Hirose Masahito, Tozawa Keiichi, Okada Atsushi, Hamamoto Shuzo, Higashibata Yuji, Gao Bin, Hayashi Yutaro, Shimizu Hideo, Kubota Yasue, Yasui Takahiro, Kohri Kenjiro: Role of osteopontin in early phase of renal crystal formation : immune-histochemical and microstructural comparisons with osteopontin knock-out mice. Urological Research, 40:121-129, 2012, 査読有り
doi: 10.1007/s00240-011-0400-z.

〔学会発表〕 (計 1 件)

- ① 広瀬 真仁、成山 泰道、福田 勝洋、窪田 裕樹、山田 泰之: 尿路結石の初期形成機序に関わる尿細管細胞のオルガネラ障害と炎症について。第 99 回日本泌尿器科学会総会、2011. 4. 21-24、名古屋市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

広瀬 真仁 (HIROSE MASAHIITO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・
研究員

研究者番号: 70529172