

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659716

研究課題名(和文) 尿路結石の分子機構の解明とその成果を踏まえた新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Biomolecular mechanism of urinary stone formation, and development of medicine

研究代表者

郡 健二郎 (Kenjiro, Kohri)

名古屋市立大学・その他部局等・学長

研究者番号：30122047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗オステオポンチン(OPN)抗体を用いた分子標的治療薬：抗オステオポンチン抗体を作成し、モデルラットで結石の形成抑制を行い、あらたな分子標的治療薬の可能性を拓いた。腎尿細管細胞ミトコンドリア障害に着目した治療薬：ミトコンドリア膜輸送体であるcyclophilin Dのノックアウトマウスを用いて、結石形成機序を解明し、その制御薬による結石抑制を試みた。マクロファージ(M<sub>2</sub>)による結晶貪食作用を応用した結石溶解療法：M<sub>2</sub>機能不全マウスを用い、結石形成・消失の動向を検証した。M<sub>2</sub>をM1 M<sub>2</sub>とM2 M<sub>2</sub>にわけて評価し、M2 M<sub>2</sub>が微小結石を消失させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：(1) Thrombin-cleaved osteopontin plays an important role in formation of renal calcium crystals and that 35B6-Ab contributes to the remarkable inhibition of early-stage renal crystal formation by preventing renal tubular cell injury and crystal-cell attachment. (2) To experimentally evaluate the clinical application of N-methyl-4-isoleucine cyclosporin, a novel selective inhibitor of cyclophilin D activation. We first report a new treatment agent determining renal calcium crystallization through cyclophilin D activation. (3) M2M<sub>2</sub> transfusion directly suppressed crystal formation and the marked crystal phagocytic ability of M2M<sub>2</sub> s.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：尿路結石 オステオポンチン ミトコンドリア マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

尿路結石の形成は、結晶の核形成・成長・凝集・結石化の4過程で形成される。私達は、その過程に OPN などの有機物質が係わり、腎尿細管細胞のミトコンドリア障害が、尿路結石の起因になっている分子機構を解明した。本研究では、これらの研究成果を踏まえ、尿路結石の新規治療薬の開発を統合的に推し進める。

(1) 抗オステオポンチン(OPN)抗体を用いた分子標的治療薬の開発：私達は、尿路結石内にわずかに数%含まれる有機物質の成分として OPN などを同定した。次いで、有機物質が係わる分子機構を世界に先がけて解明した。さらに、OPN 遺伝子欠損マウスと、結石形成に係わる2つの機能ドメイン(細胞接着部位、Ca 結合部位)の変異マウスを作成し、尿路結石は OPN の存在下で、結晶が尿細管細胞と接着し、成長して形成される機序を解明した。この結果から、細胞接着部位に隣接するトロンピン切断部位(活性型 OPN)に対する特異的な抗体を作成し、結石形成部位に発現が一致することを証明した。本研究では、この抗体を用いた分子標的治療薬の開発を目指す。

(2) 腎尿細管細胞ミトコンドリア障害に着目した治療薬の開発：尿路結石の形成初期には、酸化ストレスにより、腎尿細管細胞のミトコンドリア障害が生じ、細胞の崩壊物質が尿中結晶と結合して、結石の核を形成することを見いだした。次いで、ミトコンドリア障害が MPTP の開口異常で生じることに着目し、その阻害剤であるサイクロスポリン A (Cys A)を用い、結石形成が抑制されることを証明した。本研究では、Cys A より阻害作用が強い NIM811 を用いて予防薬の開発に向けた研究を進める。

(3) マクロファージ(M)による結晶貪食作用を応用した結石溶解療法の開発：私達は、腎 M が結晶を貪食し、「尿路結石が自然消失する」という、これまでの概念では考えにくい現象を発見した。さらに M 機能不全マウス(op/op マウス)で結石形成が促進することを証明した。本研究では、M による結石形成前の微小結石の消失を試みる。

## 2. 研究の目的

私達は、尿路結石の予防法は、無機物質が対象であったことに限界を感じ、有機物質の成分を同定し、分子機序を解明するなど、結石学の概念を変えるいくつかの発見をしてきた。本研究では、それらの研究成果を踏まえ、以下の3つの観点から新規治療薬の開発を行う。

(1) 抗オステオポンチン(OPN)抗体を用いた分子標的治療薬の開発：結石マトリックス成分であるオステオポンチン(OPN)の抗体を

作成し、モデル動物を用いて結石抑制効果を証明する。

(2) 腎尿細管細胞ミトコンドリア障害に着目した治療薬の開発：腎尿細管細胞のミトコンドリア膜輸送体(MPTP)の開口異常により、尿路結石の初期形成が始まることを発見した。本研究では、MPTP の開口阻害剤を用いた予防薬の開発を行う。

(3) マクロファージ(M)による結晶貪食作用を応用した結石溶解療法の開発：腎マクロファージ(M)の貪食作用により、モデル動物の結石が消失する現象を発見した。本研究では、M による結石消失機序を解明し、微小結石の溶解療法の開発に向け応用研究をする。

## 3. 研究の方法

(1) 抗オステオポンチン(OPN)抗体を用いた分子標的治療薬の開発：C57BL6 マウスにグリオキシル酸を9日間連続して腹腔内投与して結石モデルラット阻止した。切断型オステオポンチンの 162SLAYGLR168 に反応する抗体を作成し、投与して結石形成について、抗体の抑制効果を検討した。

(2) 腎尿細管細胞ミトコンドリア障害に着目した治療薬の開発：尿路結石の形成過程におけるミトコンドリア膜活性化因子 cyclophilin D の機能解明 MPTP の中心構造である cyclophilin D の尿路結石の形成過程における生理学的な機能および生態学的な役割を検証し、結石形成の予防法へ応用する。cyclophilin D 欠損マウスと wild type で、腎尿細管細胞やミトコンドリアの形態、細胞内カルシウム濃度、酸化ストレスなどの変化を画像解析と発現の定量化で比較、評価する。

MPTP 特異的阻害剤 NIM811 投与による結石予防効果：サイクロスポリン A のように免疫抑制作用を持たないが、MPTP(mitochondria permeability transitional pore) の中心構造である cyclophilin D (CpD) を特異的に阻害する NIM811 (N-Methyl-4-isoleucine cyclosporine) を用いる。腎尿細管培養細胞(MDCK)においてシュウ酸カルシウム結晶の暴露が引き起こすミトコンドリア崩壊を介したアポトーシスの発生を NIM811 が抑制できるかを評価する。その後、結石モデルラットにおける結石形成を NIM811(2~200mg/kg/day)が抑制するか評価する。

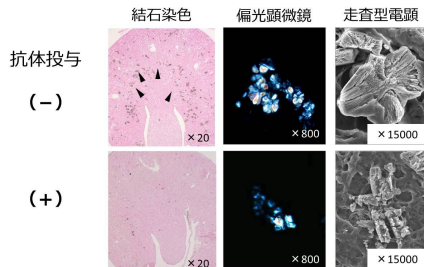
(3) マクロファージ(M)による結晶貪食作用を応用した結石溶解療法の開発：M-CSF 欠損マウス(op/op マウス)と野生型マウスの腎を摘出し、炎症型 M1 マクロファージと抗炎症型 M2 マクロファージに対する抗体を使用して、マクロファージの出現の様式の違いを検討した。シュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸を連続投与し、op/op マウス、ヘテロ、野生型の結石形成について検討した。さらに op/op マウス、ヘテロ、野生型

には、M-CSF を投与し、同様に検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 抗オステオポンチン(OPN)抗体を用いた分子標的治療薬の開発：結石モデルマウスでは、結石は花弁状に形成されていたが、抗切断型オステオポンチン抗体の投与により、結石形成が抑制された。また、抗切断型オ

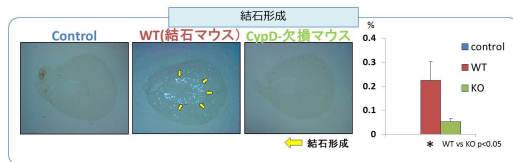
抗切断型オステオポンチン抗体による結石形成の抑制



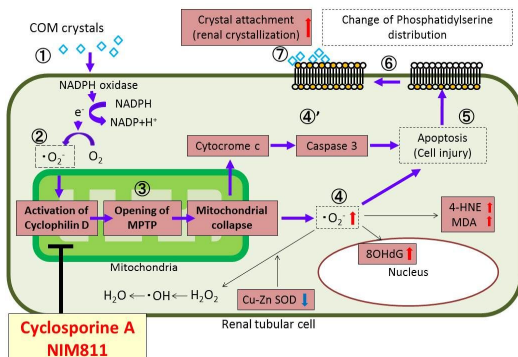
ステオポンチン抗体の投与によって、結石の前期の砂状の結晶のみが形成されていた。

(2) 腎尿細管細胞ミトコンドリア障害に着目した治療薬の開発：結石モデルマウスでは、ミトコンドリアの形態異常がおこり、酸化ストレスが発生し、結石が形成されたが、cyclophilin D 欠損マウスでは、ミトコンドリアの形態が保たれ、酸化ストレスの発生は亢

Cyclophilin D 欠損マウスによる機能解明

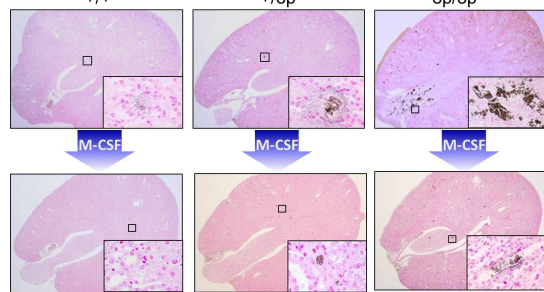


進せず、結石の形成も抑制されていた。腎尿細管細胞のミトコンドリア内に存在する cyclophilin D (CypD) が活性化することでミトコンドリア傷害が生じ、細胞傷害を介して結石形成を促進することを発見した。EG 投与により結石形成がみられ、ミトコンドリアの二重膜は断裂し、内部構造は乱れ、SOD の発現低下、MDA の産生亢進、cleaved caspase3 の発現亢進を認めた。NIM の投与により、結石形成は EG 群より有意に低下し、ミトコンドリアは形態が保たれ、SOD の発現亢進、MDA の産生低下、cleaved caspase 3 の発現低下がみられた。CypD の活性化は結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。



(3) マクロファージ (M ) による結晶貪食作用を応用した結石溶解療法の開発：M-CSF の欠損マウスである op/op マウスのマクロファージについて、炎症性 M1 マクロファージと抗炎症性 M2 マクロファージのそれぞれの表面抗体を用いて評価すると、op/op マウスの腎では M2 マクロファージが存在しないことを確認した。野生型に微量のグリオキシル酸を投与すると、野生型では結石が形成されないのに対して、op/op マウスでは結石が形成された。op/op マウスに M-CSF を投与し、M2 マクロファージの誘導を促すと、結石の形成は抑制することができた。M2 マクロファージが結石の消失現象にかかわっていること、M-CSF による M2 マクロファージの分化により結石が抑制できる可能性が示唆された。

op/opの結石形成とM-CSF補充による効果



#### 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)

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.* 2014;21(7):707-13. doi: 10.1111/iju.12425.

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.* 2014;25(8):1680-97. doi: 10.1681/ASN.2013060675.

Zuo L, Tozawa K, Okada A, Yasui T, Taguchi K, Ito Y, Hirose Y, Fujii Y, Niimi K, Hamamoto S, Ando R, Itoh Y, Zou J, Kohri K. A paracrine mechanism involving renal tubular cells, adipocytes and macrophages promotes kidney stone formation in a simulated metabolic

syndrome environment. *J Urol.* 2014;191(6):1906-12. doi: 10.1016/j.juro.2014.01.013.

Yasui T, Kobayashi T, Okada A, Hamamoto S, Hirose M, Mizuno K, Kubota Y, Umemoto Y, Kawai N, Tozawa K, Gao B, Kohri K. Long-term follow-up of nephrotoxicity in rats administered both melamine and cyanuric acid. *BMC Res Notes.* 2014;7:87. doi: 10.1186/1756-0500-7-87.

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.* 2014;42(1):17-28. doi: 10.1007/s00240-013-0612-5.

Hirose Y, Yasui T, Taguchi K, Fujii Y, Niimi K, Hamamoto S, Okada A, Kubota Y, Kawai N, Itoh Y, Tozawa K, Sasaki S, Kohri K. Oxygen nano-bubble water reduces calcium oxalate deposits and tubular cell injury in ethylene glycol-treated rat kidney. *Urolithiasis.* 2013;41(4):279-94. doi: 10.1007/s00240-013-0576-5.

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.* 2013;58(9):588-93. 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.* 2013;41(3):217-24. 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.* 2013;8(4):e61343. doi: 10.1371/journal.pone.0061343.

Itoh Y, Okada A, Yasui T, Ando R, Tozawa K, Sasaki S, Kohri K. Administration of the selective alpha 1A-adrenoceptor antagonist silodosin

facilitates expulsion of size 5-10 mm distal ureteral stones, as compared to control. *Int Urol Nephrol.* 2013;45(3):675-8. doi: 10.1007/s11255-013-0429-8.

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.* 2013;189(4):1340-6. 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.* 2012;40(6):623-37.

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.* 2012;188(3):1002-11. 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.* 2012;52(7):1207-17. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.005.

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.* 2011;26(12):2967-77. doi: 10.1002/jbmr.495.

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.* 2012;40(2):121-9. doi: 10.1007/s00240-011-0400-z.

[学会発表](計 10 件)

Atsushi Okada, Takahiro Yasui, Kazumi Taguchi, Yasuhiro Fujii, Kazuhiro

Niimi, Shuzo Hamamoto, Masahito Hirose, Ryosuke Ando, Yasue Kubota, Yasunori Itoh, Keiichi Tozawa, Kenjiro Kohri. Possible new urine markers for calcium oxalate "stone formers": macrophage-related cytokines/chemokines detected by multiplex analysis. 2014 (109<sup>th</sup>) Annual Meeting of American Urological Association (Orlando, Florida, USA) May. 16-21. 2014 (May 18)

Kazuhiro Niimi, Kazumi Taguchi, Yasuhiko Hirose, Masahito Hirose, Shuzo Hamamoto, Ryosuke Ando, Atsushi OKada, Takahiro Yasui, Keichi Tozawa, Kenjiro Kohri. Development of a new biomarker and treatment strategy for kidney stone disease targeting mitochondrial cyclophilin D activity. 2014 (109<sup>th</sup>) Annual Meeting of American Urological Association (Orlando, Florida, USA) May. 16-21. 2014 (May 18)

新美和寛、藤井泰普、伊藤靖彦、高田英輝、広瀬真仁、岡田淳志、窪田泰江、安井孝周、戸澤啓一、郡健二郎。ミトコンドリア cyclophilin D をターゲットとした尿路結石に対する新規治療薬と尿中バイオマーカーの開発。第 102 回日本泌尿器科学会総会(兵庫県神戸市)2014.4.24-27(4.24 発表)

岡田淳志、田口和己、藤井泰普、新美和寛、瀧本周造、安井孝周、広瀬真仁、戸澤啓一、郡健二郎。マルチプレックス解析を用いた尿路結石患者に特異的な尿中マクロファージ関連因子の同定。第 102 回日本泌尿器科学会総会(兵庫県神戸市)2014.4.24-27(4.24 発表)

田口和己、岡田淳志、安井孝周、廣瀬泰彦、新美和寛、瀧本周造、安藤亮介、伊藤恭典、戸澤啓一、郡健二郎。腎結石溶解療法を開発を目指した抗炎症マクロファージ(M2)による結晶貪食作用の解明。第 102 回日本泌尿器科学会総会(兵庫県神戸市)2014.4.24-27(4.24 発表)

田口和己、岡田淳志、安井孝周、新美和寛、安藤亮介、戸澤啓一、郡健二郎。CSF-1 誘導による抗炎症性マクロファージ(M2)を用いた腎結石の新規防御法の開発。第 56 回日本腎臓学会学術総会(東京都千代田区)2013.5.10-12(発表:5.10 発表)

新美和寛、安井孝周、岡田淳志、戸澤啓一、郡健二郎。ミトコンドリア傷害から見た尿路結石の形成機序～治療薬の開発とバイオマーカーの確立～。第 56 回日本腎臓学会学術総会(東京都千代田区)2013.5.10-12(発表:5.10 発表)

Kazumi Taguchi, Atsushi OKada, Takahiro Yasui, Kazuhiro Niimi, Yasuhiro Fujii, Shuzo Hamamoto, Masahito Hirose, Yukihiro Umemoto, Shoichi Sasaki, Kenjiro Kohri. Anti-inflammatory M2 macrophages suppress renal crystal formation via a colony stimulating factor-1 dependent pathway in M2-deficient (op/op) mice. 2013 (108<sup>th</sup>) Annual Meeting of American Urological Association (San Diego, California, USA) May. 4-8. 2013 (May 8)

Yasuhiro Fujii, Atsushi OKada, Kazumi Taguchi, Kazuhiro Niimi, Shuzo Hamamoto, Masahito Hirose, Takahiro Yasui, Kenjiro Kohri. Elucidation of metabolic syndrome-related paracrine system by co-culturing renal tubular epithelial cells and adipocytes. 2013 (108<sup>th</sup>) 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. 4-8. 2013 (May 5)

〔図書〕(計 1 件)

安井孝周 他、南江堂、ベッドサイド泌尿器科学(改訂第 4 版)2013, 844-847

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/uro.dir/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

郡 健二郎 (KOHRI, Kenjiro)

名古屋市立大学・その他部局等・学長

研究者番号: 30122047

(2)研究分担者

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

安井 孝周 (YASUI, Takahiro)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：40326153

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：70444966

濱本 周造 (HAMAMOTO, Shuzo)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：80551267