

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462520

研究課題名(和文) 尿路結石形成におけるミトコンドリア膜をターゲットにした機能解明と予防法への応用

研究課題名(英文) Functional analysis of urinary stone formation to target the mitochondrial membrane and its application to prophylaxis

研究代表者

遠藤 純央 (Endo, Sumio)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：30646823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではcyclophilin D欠損マウスを用いて、尿路結石の形成初期におけるcyclophilin Dの作用を分子レベルで解明し、cyclophilin Dを不活化させることによる尿路結石の予防薬の開発を目的とした。腎尿細管細胞にシュウ酸刺激などの酸化ストレスが加わると、cyclophilin Dが活性しミトコンドリアが崩壊する。このことが酸化ストレスの発生、尿路結石形成を促進させることを解明した。更にcyclophilin Dを不活化させることによる尿路結石形成の抑制を証明できたので、今後、予防薬の開発へとつながる研究であったと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study by using the cyclophilin D deficient mice, we elucidate the effect of cyclophilin D to the formation of urinary tract stones in initial step at the molecular level, and aimed at the development of a prophylactic agent of urinary tract stones by inactivation of cyclophilin D. When the oxidative stress such as oxalic acid stimulation applies to renal tubular cells, cyclophilin D is active and mitochondria collapse. This promotes oxidative stress and formation of urinary tract stone, we elucidat. So we prove inactivation of cyclophilin D suppress urinary stone formation. We think that it is a study that leads to the development of preventive medicine of the urinary stone.

研究分野：尿路結石

キーワード：尿路結石 cyclophilin D ミトコンドリア 酸化ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 尿路結石の生涯発症率は食文化の欧米化に伴い上昇し、わが国では男性 100 人中 15 人にも達している。よってその成因の究明と再発予防法の確立は急務である。遺伝子レベルで尿路結石の病態解明が進んでいるが、いまだ再発予防法は確立されていない。

(2) 私たちは、結石形成時に腎尿細管細胞傷害および酸化ストレスの存在を証明した。さらに、結石形成時には、透過型電子顕微鏡によりミトコンドリアの二重膜構造が崩壊し、形態が変化することを確認した(ミトコンドリアの崩壊)。近年、尿路結石形成時には、細胞内のミトコンドリア傷害により活性酸素が発生することが明らかになった。

(3) ミトコンドリアの傷害が発生するメカニズムで重要な役割を担っているのが mitochondrial permeability transition (MPT) である。MPT とはミトコンドリアに  $Ca^{2+}$  や酸化ストレスが加わると、内膜の透過性が亢進し、ミトコンドリアが膨潤し機能破綻を来す現象であり、MPT が発生した細胞は細胞死へと至る。cyclophilin D はミトコンドリアマトリック蛋白であり、MPT を制御している。Cyclophilin D を阻止することで、MPT、ミトコンドリアの崩壊、さらには酸化ストレスを抑制し、腎尿細管細胞傷害を軽減させて尿路結石を予防できると考え、本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、結石形成初期における腎尿細管細胞での病態、特に MPT と cyclophilin D が関与している病態を分子レベルで解明し、予防法の開発に応用することを目的とする。

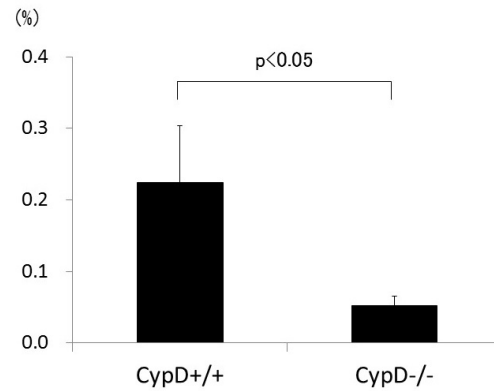
### 3. 研究の方法

8 週齢雄の cyclophilin D 欠損マウス群 (n=10) と野生型マウス群 (n=10) にシュウ酸の前駆物質であるグリオキシル酸 (80mg/kg) を 6 日間連続で腹腔内投与を行い、結石形成モデルとした。それぞれの群の尿と血液を採取し、さらに腎を摘出する。摘出した腎組織(腎尿細管細胞)において結石形成量やミトコンドリアの形態、各種酸化ストレスマーカー、結石マトリックスの発現を評価し、その発現の程度を画像解析ソフトを用いて定量化する。また尿・血液検体から尿中シュウ酸・クエン酸、血液生化学検査を行い、その評価を 2 群間で比較検討する。

### 4. 研究成果

(1) グリオキシル酸を投与することにより野生型マウス群では腎の皮髄境界部を中心に著名な結石を認めた。しかし cyclophilin D 欠損マウス群では結石形成が抑制された。画像解析ソフトを用いて結石形成量を定量化し統計学的検討を行ったところ、両群間には

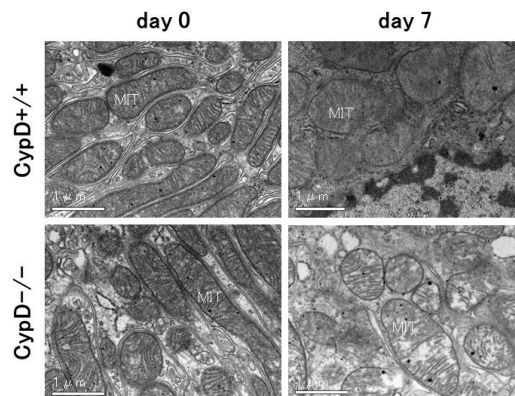
有意差を認めた(下図)。



(2) 酸化ストレスのマーカーである MDA (malondialdehyde) と SOD (superoxide dismutase) に関して検討を行った。検討方法は腎組織の免疫染色法ならびに画像ソフトを用いた定量化と統計学的検討である。グリオキシル酸を投与することにより野生型マウス群では腎組織に酸化ストレスの発生を高度に認めたが、cyclophilin D 欠損型マウス群ではその発生は有意に抑制されていた。

結石マトリックスである OPN (osteopontin) についても同様の手法を用いて検討を行った。野生型マウス群では腎組織に OPN の発現を高度に認めたが、cyclophilin D 欠損型マウス群ではその発現は有意に抑制されていた。

(3) TEM (透過型電子顕微鏡; transmission electron microscope) を用いてミトコンドリアの観察を行った。グリオキシル酸投与により野生型マウス群のミトコンドリアの形態は二重膜構造が崩壊し、ミトコンドリア自体の膨潤を認めた。しかし cyclophilin D 欠損型マウス群ではそれらの形態的变化は皆無ではないが乏しかった(下図)。

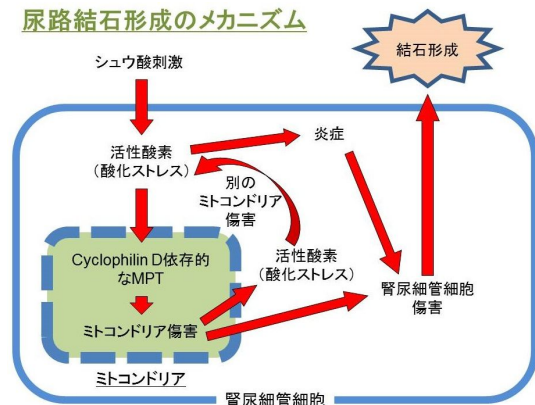


(4) 炎症のマーカーである MCP-1、TNF、IL-6 に関して検討を行った。検討は腎組織の細胞を用いて各種マーカーの PCR を行い、蛋白発現量を定量的に検討した。グリオキシル酸を投与する前では野生型マウス群にも cyclophilin D 欠損型マウス群にも炎症の発

現はほとんど認めなかった。グリオキシル酸を投与することにより両群とも腎組織内に炎症の発現を認めた。両群間には統計学的な有意差は認めなかった。

(5) 以上の結果より下図に示したような尿路結石形成のメカニズムが示唆された。

#### 尿路結石形成のメカニズム



腎尿細管細胞にシュウ酸刺激などが加わることで細胞内に活性酸素の生成による酸化ストレスが生じる(シュウ酸由来の酸化ストレス)。酸化ストレスは cyclophilin D を活性化させるトリガーとされている[1]。活性化した cyclophilin D は cyclophilin D 依存的な MPT を引き起こし、ミトコンドリアは内部の二重膜が崩壊、膨潤し機能が破綻する[2]。

破綻したミトコンドリアからも活性酸素・酸化ストレスが発生する(ミトコンドリア由来の酸化ストレス)。野生型群と cyclophilin D 欠損群ではシュウ酸由来の酸化ストレスの発生には差はないが、ミトコンドリア傷害に差があるため、ミトコンドリア由来の酸化ストレス発生は大きく異なってくる。本実験で cyclophilin D が欠損することにより(cyclophilin D 依存的な MPT を抑制することにより)有意に酸化ストレスの発生が抑制されることから、尿路結石形成に関してはシュウ酸由来の酸化ストレスよりもミトコンドリア由来の酸化ストレスの方が程度が高度でかつ重要な役割を担っていることが示唆された。

ミトコンドリア由来の酸化ストレスも同様に cyclophilin D 活性化のトリガーとなるため、他の細胞の cyclophilin D 依存的な MPT を引き起こす。このようなサイクルでもって、腎組織内のミトコンドリア傷害が増幅され、腎尿細管細胞傷害へと至る。腎尿細管細胞が傷害されることにより尿路結石形成が成される。

炎症に関しては cyclophilin D 依存的な MPT に依存していない。このことはシュウ酸刺激によって腎細胞内に炎症が生じたのであり、cyclophilin D 依存的な MPT によって炎症が生じるのではないことを示唆している。また cyclophilin D 欠損マウス群であっても結石形成が全くされない訳ではなく、少

量の結石が形成されることは、cyclophilin D 依存的な MPT によらない結石形成メカニズムの存在を示唆しており、炎症がその経路であると考えられた。

#### 引用文献

[1] Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca(2+) exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice. Elrod JW et al. J Clin Invest. 2010 Oct;120(10):3680-7.

[2] シクロフィリン D に依存したネクローシス、辻本賀英、医学のあゆみ 2013 May; 246(5):369-375

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

1. 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. 査読有, 2014 Jul;21(7):707-13. doi: 10.1111/iju. 12425.
2. 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. 査読有, 2012 Apr 1;52(7):1207-17. doi: 10.1016 / j.freeradbiomed. 2012.01. 005.

[学会発表](計3件)

1. Yasuhiko Ito, Kazuhiro Niimi, Takahiro Yasui, Shoichiro Iwatsuki, Takashi Hamakawa, Kazumi Taguchi, Yasuhiro Fujii, Yasuhiko Hirose, Shuzo Hamamoto, Atsushi Okada, Yukihiro Umemoto, Keiichi Tozawa, Kenjiro Kohri. Mitochondrial collapse depends on Cyclophilin D in renal tubular cells promotes kidney stone formation. AUA 2015 Annual Meeting , 2015.5.15-19, New Orleans (USA)
2. 伊藤 靖彦、安井 孝周、海野 怜、新美 和寛、田口 和己、安藤 亮介、岡田 淳志、戸澤 啓一、郡 健二郎、辻本賀英 : Cyclophilin D 欠損マウスを用いた尿路結石形成におけるミトコンドリア傷害機序の解明。第 103 回日本泌尿器科学会総会、2015.4.18-21、石川県立音楽堂 他(石川県金沢市)
3. 伊藤 靖彦、新美 和寛、安井 孝周、

田口 和己、廣瀬 泰彦、藤井 泰普、  
宇佐美 雅之、小林 隆宏、安藤 亮介、  
広瀬 真仁、岡田 淳志、伊藤 恭典、  
戸澤 啓一、郡 健二郎：Cyclophilin D  
欠損マウスを用いた尿路結石形成にお  
けるミトコンドリア傷害機序の解明。日  
本尿路結石症学会第 23 回学術集会、  
2013.8.30-31、学術総合センター（東京  
都千代田区）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/uro.dir/  
outline/research\\_kesseki.html](http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/uro.dir/outline/research_kesseki.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遠藤 純央 (Endo, Sumio)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研  
究員

研究者番号：30646823

### (2) 研究分担者

郡 健二郎 (Kohri, Kenjiro)

名古屋市立大学・学長

研究者番号：30122047

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

新美 和寛 (Niimi, Kazuhiro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研  
究員

研究者番号：70551274

### (3) 研究協力者

伊藤 靖彦 (Ito, Yasuhiko)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研  
究員