

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：25462523

研究課題名(和文) 女性ホルモンの抗酸化作用による尿路結石の抑制機構の解明とその臨床応用

研究課題名(英文) Elucidation of the inhibiting mechanism of the urolithiasis using the antioxidant effect of the female hormone and the clinical application

研究代表者

広瀬 真仁 (Hirose, Masahito)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：70529172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

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が少ない理由を解明するために、結石形成の性差について検討を行った。成果は、以下の3点である。結石の形成過程を超微細構造のレベルで明らかにした。女性ホルモンの結石抑制作用を明らかにした。女性ホルモンと結石関連遺伝子オステオポンチンの関係を解明した。また、本研究の成果から、女性ホルモンを応用した新たな結石予防薬の可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined about sex differences in period of stone formation, for the elucidation about stone formation mechanism and the reason that the woman urolithiasis patient is few. The result is following three points. We clarified a stone formation process at an ultrastructural level. We clarified stone formation inhibiting effect of the female hormone. We elucidated the relationship of female hormone and the stone-related gene: osteopontin. In addition, the possibility of the new calculus prevention using female hormone was thought by the result of this study.

研究分野：腎泌尿器科学、尿路結石症

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 オステオポンチン

1. 研究開始当初の背景

わが国における尿路結石の発症率は、この40年間で約3倍にも増加した。5年再発率も40~50%と高いが、発症機序の詳細は不明で、予防薬はない。現在の飲水と食事指導による結石予防法では結石の再発を抑制することができず、新たな予防法の開発が望まれている。

2005年の全国疫学調査において、結石の生涯罹患率は、男性15.1%、女性6.8%と女性で低い。特に、若年女性ではほとんど発症しないことが明らかになった。その理由として、女性ホルモンが肝臓で、シュウ酸産生を抑制する酵素(SPT/AGT)の発現を促し、尿中シュウ酸排泄量を減らすために結石が形成されにくいと報告されてきた。しかし、日本人のほとんどの結石患者は高シュウ酸尿を伴わないため、女性には他の結石形成を抑制する機序があると考えられる。

そこで私達は、女性ホルモンが抗酸化作用を持ち、動脈硬化を抑制するという最近の報告に着目した。これまでに私達は、結石の形成機序に酸化ストレスや細胞傷害が係わっており、動脈硬化と似ていることを見いだした。しかし、女性ホルモンの結石形成における抗酸化ストレス作用は明らかではない。そのメカニズムを明らかにすることは、結石形成機序の解明と、新たな予防薬の開発へ応用が期待できる。

2. 研究の目的

尿路結石の発症率は女性では男性より低い。このことから、女性ホルモンが結石形成を抑制していると考えられるが、その機序は明らかではない。最近、女性ホルモン(エストロゲン)による抗酸化作用が動脈硬化を抑制することが報告された。私は、これまでの若手研究B(H21-22、H23-24)などにおいて結石の発症機序が動脈硬化と似ていることを報告した。さらに、結石形成の初期段階には、酸化ストレスによる腎尿細管細胞障害が係わっていることを明らかにした。これらのことを踏まえ、本研究では、女性ホルモンがもつ結石の抑制機構を、特に腎尿細管細胞の微細構造の変化に着目し、酸化ストレスと細胞障害の観点から解明する。さらに、女性ホルモンのこれらの作用を応用し、結石予防

薬を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

私達は、シュウ酸の前駆物質であるグリオキシル酸を8週齢のC57BL/6マウスに腹腔内投与し、実験的尿路結石の作成に成功した。この結石形成モデルマウスでは、投与3-6日目で腎に微小結石の形成が確認出来る。このモデルでは雌でも結石の形成を認める。本研究では、主にこの結石モデルマウスおよびノックアウトマウス、トランスジェニックマウスを用い、結石形成過程において雄・雌の比較検討を行う。そして、結石形成期における細胞障害・ミトコンドリア障害と女性ホルモンの関わり、および結石マトリックスと女性ホルモンとの具体的な関係について明らかにする。これらの結果から、結石形成機序を解明し、女性ホルモンを応用した予防薬の開発を行う。

本研究では、下記の点について明らかにする。

(1) 女性ホルモンの抗酸化作用から見た尿路結石形成機序の解明

結石モデルマウスを用いて、結石形成期における腎尿細管細胞の微細構造の変化を明らかにする。特に、雌雄による違いを中心に検討し、結石に対する女性ホルモンの作用を解明する。

OPNノックアウトマウスを用いて、結石形成における微細構造の変化を経時的に観察する。また、電子顕微鏡を用いた免疫染色法で、結石モデルマウスにおけるOPNの局在と動態を検討し、女性ホルモンとの関係を明らかにする。これらの結果を踏まえ、結石の形成機序を推測する。

(2) 女性ホルモンの抗酸化作用を用いた新規予防薬の開発

結石モデル動物へ、女性ホルモン様の抗細胞障害物質を投与し、予防効果を検討する。結石患者への投与を行った上で、効果を確認し、新規予防薬の開発を行う。

腎尿細管細胞とミトコンドリア障害からみた雌雄の違い(1)-

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。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、ミ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の免疫組織学的検討を免疫染色法、western blotting 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。

女性ホルモンによる腎尿細管細胞とミトコンドリア障害への影響(1)-

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。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、western blotting 法、RT-PCR 法、そして24時間尿生化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。

電子顕微鏡を用いたOPNの免疫染色法(1)-

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、ミ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。

結石形成期における女性ホルモンとOPNの関係(1)-

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腎組織内でのOPNの局在と動態を詳細に検討する。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、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。

結石形成予防法の開発(2)-

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、女性ホルモン様の抗細胞障害物質を投与し、予防効果の検討を行う。その後、結石患者への投与を行った上で、効果を確認し、新規予防薬の開発を行う。

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雌雄の違い(1)-

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、主に透過型電子顕微鏡を用いて数時間毎に仔細に形態学的、分子生物学的に検討し、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していることが明らかになった。メスのマウスでは、これらの形態変化が、オスに比べて、やや遅く経過している傾向が見受けられた。

この結果は、女性ホルモンが結石形成期に起きる細胞障害およびミトコンドリア障害に対する防御作用を持っている可能性が示唆された。

この研究で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し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。

女性ホルモンによる腎尿細管細胞とミトコンドリア障害への影響 ((1)-)

雌のモデルマウスでは、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すという形態変化が雄のモデルマウスに比べて遅く進むが、卵巣摘除雌マウスでは、通常雌よりもやや早く形態変化が起きているように思われた。また、ミトコンドリアや尿細管細胞の形態は女性ホルモンがない状況だと障害が大きい傾向に思われた。

この結果は、「腎尿細管細胞とミトコンドリア障害からみた雌雄の違い」で起きた雌雄の差が女性ホルモンにより引き起こされたものと考えさせるものであった。つまり、女性ホルモンが、抗細胞障害作用を持ち、ミトコンドリアの保護をして、結石形成に対し予防的に作用していたことをさらに示唆するものであった。

電子顕微鏡を用いた OPN の免疫染色法 ((1)-)

結石モデルマウスでは、グリオキシル酸投与後から遠位尿細管管腔側に OPN が発現。特に障害され、崩壊した細胞周囲に発現している。その後、崩壊したミトコンドリアや微絨毛とともに管腔内へ OPN が出現し、管腔内の OPN が崩壊物質とともに結晶核を形成し始める。

この結果は、以前より OPN が結石の原因なのか、抑制物質となるのか、結石の形成へ及ぼす作用は明らかではなかった。しかし、結石の形成初期に OPN が出現しており、結石に含有されるように観察されることから結石の形成を担う物質の一つである可能性が考えられた。

結石形成期における女性ホルモンと OPN の関係 ((1)-)

雌において、OPN は初期では雄より多く発現しており、数日たつと雄よりも少なくなっている傾向を認めた。そして、OPN ノックアウトマウスを用いた検討では、モデルマウスと比べて、雄雌ともに結石の形成が遅く、形成量が少ない。さらに、モデルマウスだと認められた結石の消失現象が、雄だと認められなくなっている。

この結果は、女性ホルモンが結石形成期に起きる細胞障害およびミトコンドリア障害に対する防御作用として、OPN の発現との関係を示すとともに、消失現象にも関与している可能性が考えられた。

本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における OPN の作用を明らかにし、女性ホルモンが結石の消失についても影響し、重要であることを示すものであった。

結石形成予防法の開発 ((2))

マウスへ女性ホルモン類似作用を持つ物質であるイソフラボンを用いて結石の予防効果の研究を開始した。現在のところ、本項目については研究中であり、投与方法や投与量の調整を行っており、結石の予防薬になりえるかは、結果が出ていない。しかし、今までの研究成果からすると、結石の予防効果はあると予想される。もともと健康食品などで用いられている物質でもあり、結果が出れば、人体への投与も危険性が少ないのではないかと考えている。

このような物質が予防薬となることができれば、予防投薬の垣根が低くなり、尿路結石患者の再発率の低下に貢献するのではないかと考えている。

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 0 件)

[学会発表] (計 10 件)

1. Hirose Masahito, Banno Rika, Kanemoto Kazuhiro, Okada Atsushi, Yasui Takahiro, Sakakura Takeshi, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: The role of renal tubular cell injury in the

- early period of renal crystal formation identified from the cell injury-inhibiting effect of green tea. American Urological Association Annual Meeting 2015, 2015.5.15-19, New Orleans (USA)
2. Yasui Takahiro, Niimi Kazuhiro, Okada Atsushi, Taguchi Kazumi, Fujii Yasuhiro, Hirose Yasuhiko, Ito Yasuhiko, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Tozawa Keiichi, Sasaki Shoichiro, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: N-methyl-4-isoleucine cyclosporine, an inhibitor of mitochondrial cyclophilin D activation, prevents kidney stone formation by alleviating oxidative stress in renal tubular cells. American Urological Association Annual Meeting 2015, 2015.5.15-19, New Orleans (USA)
 3. 伊藤 靖彦、安井 孝周、新美 和寛、海野 怜、田口 和己、安藤 亮介、岡田 淳志、戸澤 啓一、辻本 賀英、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。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)
 4. Okada Atsushi, Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Itoh Yasunori, Yasui Takahiro, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: The roles of osteopontin in the kidney stone formation process as a stone matrix and activator of crystal elimination by macrophages. The 30th Annual Congress of the European Association of Urology, 2015.3.20-24, Madrid (Spain)
 5. Yasui Takahiro, Niimi Kazuhiro, Okada Atsushi, Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Tozawa Keiichi, Sasaki Shoichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro, Rodgers Allen: N-methyl-4-isoleucine cyclosporine: An inhibitor of cyclophilin D activation, prevents kidney stone formation by alleviating oxidative stress. SIU 2014, 2014.10.12-15, Glasgow (Scotland)
 6. 藤井 泰普、岡田 淳志、海野 怜、伊藤 靖彦、市川 潤、田口 和己、新美 和寛、廣瀬 泰彦、小林 隆宏、宇佐美 雅之、瀧本 周造、広瀬 真仁、安井 孝周、伊藤 恭典、坂倉 毅、戸澤 啓一、郡 健二郎: 腎尿細管細胞・脂肪細胞・マクロファージの共培養システムを用いたメタボリックシンドローム環境下の結石形成機序の解明。第 24 回日本尿路結石症学会、2014.8.29-30、天王寺都ホテル 他 (大阪府大阪市)
 7. Yasui Takahiro, Okada Atsushi, Taguchi Kazumi, Hirose Yasuhiko, Fujii Yasuhiro, Niimi Kazuhiro, Hamamoto Shuzo, Kobayashi Takahiro, Hirose Masahito, Ando Ryosuke, Itoh Yasunori, Tozawa Keiichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Bisphosphonate prevents the recurrence of urolithiasis in men with osteoporosis. American Urological Association Annual Meeting 2014, 2014.5.16-21, Orlando (USA)
 8. Niimi Kazuhiro, Taguchi Kazumi, Hirose Yasuhiko, Hirose Masahito, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Okada Atsushi, Yasui Takahiro, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Development of a new biomarker and treatment strategy for kidney stone disease targeting mitochondrial cyclophilin D activity. American Urological Association Annual Meeting 2014, 2014.5.16-21, Orlando (USA)
 9. 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、2014.4.24-27、神戸国際会議場 他 (兵庫県神戸市)
 10. Yasui Takahiro, Okada Atsushi, Kohri Kenjiro: Investigation of the effects of herbal teas rich in anti-oxidants on urine chemistry, in the context of kidney stone formation. NRS-JSPS Joint

Research Project, Cape Town Research Meeting, 2014.1.29, Cape Town (Republic of South Africa)

〔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 なし

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

郡 健二郎 (KOHR I 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)連携研究者 なし