

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462528

研究課題名(和文) 結石マトリックスタンパク質プロテインZの動脈硬化における役割の探索

研究課題名(英文) Role of protein Z that is one of urinary stone matrix proteins in the progress of arteriosclerosis

研究代表者

金子 希代子 (Kaneko, Kiyoko)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：90147075

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)：血栓や動脈硬化は生命に関わる重篤な病態である。私達は尿路結石の微細分析を行い、血液凝固を抑制するプロテインZが高頻度に尿路結石中に含まれることを確認し、プロテインZの尿路結石の形成における役割を調べた。その結果、プロテインZはシュウ酸カルシウム結石で特異的に検出され、プロテインZが脂質膜上でシュウ酸カルシウム一水和物の結晶を増大させることを発見した。プロテインZは血液凝固を抑制するため血栓の形成を抑えることが期待されるが、尿路結石の生成においては異なる働きをすると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A thrombus and arteriosclerosis are the severe clinical condition of the life. We analyzed urinary stones in detail, and confirmed that protein Z which suppresses blood clotting was included in a high frequency in the urinary stone and examined its role in the formation of urinary calculus. As a result, protein Z was detected in urinary stones that was composed of calcium oxalate monohydrate and it was found that protein Z made crystal of calcium oxalate monohydrate increase on the lipid membrane. Protein Z is expected to suppress blood clotting, but it is considered that protein Z has different role on generation of urinary calculus.

研究分野：分析化学

キーワード：プロテインZ 尿路結石症 マトリックスタンパク質 シュウ酸カルシウム結晶

1. 研究開始当初の背景

(1) 高尿酸血症では尿路結石の合併が多いことから、筆者らは尿路結石の微細分析を行い、結石マトリックスタンパク質として、プロテイン Z、オステオポンチン、プロトロンビン、ガシウ酸カルシウム一水和物結石に頻繁に検出されることを見出した。

(2) オステオポンチンとプロトロンビンに関しては研究が進められているが、プロテイン Z に関する研究はあまり多くない。血中のプロテイン Z は血液凝固を抑制する働きを持つことが知られるが、尿路結石生成においてプロテイン Z がどのような役割を果たすか報告されていない。また、プロテイン Z が血液凝固を抑制することから、心筋梗塞や脳梗塞を引き起こす重篤な病態である血栓や動脈硬化において何らかの役割を果たす可能性があるが、それもわかっていない。

2. 研究の目的

尿路結石に存在し血液凝固を抑制するプロテイン Z が、尿路結石の形成、および高尿酸血症など動脈硬化に関連する病態において、どのような役割を演じているかを調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シュウ酸カルシウム一水和物 (COM) 結晶の生成実験を始める前に、シュウ酸カルシウムと他の成分を含む混合結石を成分別に微細に分析した。具体的には、シュウ酸カルシウムと炭酸カルシウム結石、シュウ酸カルシウムと尿酸結石の 2 種類の尿路結石を、微小領域 X 線回折装置と赤外分光光度計を用いて、まず結晶成分を同定した。続いて、タンパク質を 4 種類の抽出溶媒 (0.6M KCl, 10% HCOOH, 4M Guanidine-HCl, 0.5M EDTA) により抽出した後、SDS-ポリアリルアミドゲル電気泳動で分離して、ゲルからスポットを切り出してトリプシン消化した。得られたペプチド混合物を液体クロマトグラフィー質量分析装置 (LC-MS/MS) で測定し、その結果をタンパク質のデータベースと比較して、尿路結石に含まれるタンパク質を同定した。

(2) In vitro での COM 結晶生成/成長ならびに COM 結晶凝集実験から、プロテイン Z の結石形成に及ぼす影響を確認した。また、尿路結石から同時に検出されるオステオポンチン、プロトロンビンの影響も調べた。結晶凝集の確認方法として、倒立顕微鏡での観察ならびに分光光度計による吸光度の測定による結晶の凝集を調べた。顕微鏡による結晶面積と凝集の大きさは、画像統合ソフトウェア (NIKON NIS-ElementsD) を用いて行った。

(3) これらの実験を、通常の培養プレート (24 well) ならびに脂質膜をコートしたプレート (96 well) を使用して検討した。脂質膜上の COM 結晶は、偏光顕微鏡を用いて観察した。顕微鏡による観察結果は、(2)と同じ画像統合ソフトウェア (NIKON NIS-ElementsD) を用いて行った。

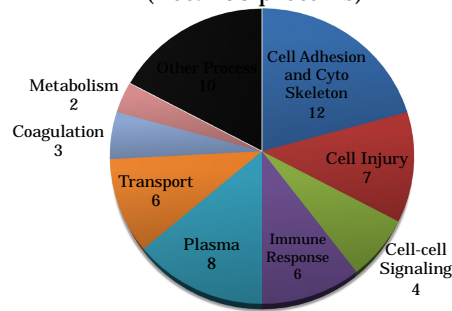
4. 研究成果

(1) 混合結石の分析

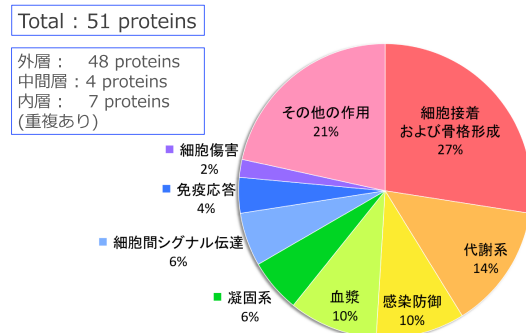
2 種類の異なる成分を有する混合結石を、微小領域 X 線回折装置と赤外分光光度計を用いて結晶成分を調べた結果、1 つは炭酸カルシウムとシュウ酸カルシウム二水和物で構成される尿路結石、他の 1 つは内側が尿酸で外側がシュウ酸カルシウムで構成される尿路結石であった。

これらの尿路結石から、LC-MS/MS によるプロテオミクスでタンパク質を分析した結果、炭酸カルシウムとシュウ酸カルシウム二水和物で構成される尿路結石から 58 種類の細胞接着、細胞障害、免疫、血液凝固、血漿に関連するタンパク質が同定された。また、シュウ酸カルシウムと尿酸で構成される尿路結石からは 51 種類の細胞接着、代謝系、感染制御、血液凝固、血漿に関連するタンパク質が同定された。

炭酸カルシウムとシュウ酸カルシウム二水和物の混合結石全体に含まれる蛋白質の機能別割合 (Total 58 proteins)



尿酸とシュウ酸カルシウム 1 水和物の混合結石に含まれる蛋白質の機能別割合



2種類の結石とも、プロテインZはシュウ酸カルシウムを成分とする部位からのみ検出された。また、今までのシュウ酸カルシウム水和物結石と同様に、オステオポンチン、プロトロンピン、と共に検出された。

(2) COM 結晶生成/成長と COM 結晶凝集

培養プレートを用いて COM 結晶の生成/成長を顕微鏡で観察後、結晶 100 個あたりの面積を比較した結果、プロテイン Z はあまり影響を与えず、プロテイン Z にオステオポンチンやプロトロンピンを加えた際に面積を増大させた。

COM 結晶の凝集に関しては、凝集結晶径と凝集結晶数に逆相関の関係があることが判明した。また、プロテイン Z、オステオポンチン、プロトロンピンを添加すると、コントロールより結晶径が大きくなりその数は減少した。

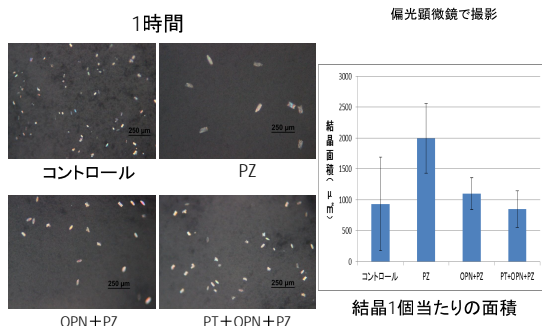
COM 結晶の生成/成長と凝集の結果を合わせると、プロテイン Z は、生成/成長は変化させず、凝集を抑制する傾向であった。それにオステオポンチンやプロトロンピンを加えると、生成/成長と凝集のいずれも促進させる傾向であった。

(3) 脂質膜上における COM 結晶生成/成長と COM 結晶凝集

脂質膜をコートしたプレートを用いて、プレート底面における COM 結晶の生成/成長を倒立顕微鏡で、脂質膜上に生成された COM 結晶を偏光顕微鏡で観察した。その結果、プレート底面ではタンパク質を加えることによる変化は見られなかったが、脂質膜上ではプロテイン Z を添加することで結晶 1 個あたりの面積が増大する傾向が認められた(下図)。さらにオステオポンチンやプロトロンピンを加えると脂質膜上の結晶数は増えるが 1 個あたりの面積はコントロールと変わらなかった。

脂質膜を用いた場合には、凝集結晶はプレート底面、脂質膜上、ともにあまり認められなかった。

リン脂質膜上におけるシュウ酸カルシウム結晶の生成



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7件)

- (1) Kiyoko Kaneko, Shin-ichiro Nishii, Yoko Izumi, Makoto Yasuda, Tomoyo Yamanobe, Tomoko Fukuuchi, Noriko Yamaoka, and Shigeo Horie. Proteomic Analysis after Sequential Extraction of Matrix Proteins in Urinary Stones Composed of Calcium Oxalate Monohydrate and Calcium Oxalate Dihydrate. *Ana Sci* 31(9): 935-942, 2015 査読有
doi: 10.2116/analsci.31.935
- (2) 金子希代子: 「高尿酸血症と食事について」*日本尿路結石症学会誌* 14(2): 57-62, 2015 査読無
- (3) 金子希代子, 渡邊圭琢, 樋口陽子, 福内友子, 山岡法子. 尿路結石 matrix protein の COM 結晶の生成と凝集におよぼす影響。*日本尿路結石症学会誌* 14(2): 222-225, 2015 査読無
- (4) Kiyoko Kaneko, Hiro Iwamoto, Makoto Yasuda, Katsunori Inazawa, Noriko Yamaoka, Tomoko Fukuuchi, Yoshifuru Tamura, Shunya Uchida, Ken-ichi Mawatari, Kazuya Nakagomi, Yasukazu Yamada, and Shin Fujimori. Proteomic analysis to examine the role of matrix proteins in a gouty tophus from a patient with recurrent gout. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 33: 199-207, 2014 査読有
doi: 10.1080/15257770.2014.880476
- (5) 金子希代子, 金子佳冬: 「巻頭グラビア」目でみる 食事療法 -尿路結石症を合併する痛風・高尿酸血症の食事療法-。*高尿酸血症と痛風* 22 (1): 1-5, 2014 査読無
- (6) 地島宜玄, 金子希代子, 松田陽介, 森山学, 榎田絢子, 安田 誠, 山岡法子, 福内友子, 宮澤克人, 鈴木孝治. 炭酸カルシウムと COD から成る尿路結石の結晶成分分析およびプロテオーム解析。*日本尿路結石症学会誌* 12(2): 80-83, 2014 査読無
- (7) Kiyoko Kaneko, Yosuke Matsuta, Manabu Moriyama, Makoto Yasuda, Noriharu Chishima, Noriko Yamaoka, Tomoko Fukuuchi, Katsuhito Miyazawa, and Koji Suzuki. Proteomic analysis of a rare urinary stone composed of calcium carbonate and calcium oxalate dihydrate: A case report. *Int J Urol*, 21: 341-346, 2014. 査読有
doi: 10.1111/iju.12282, 2013

〔学会発表〕(計7件)

- (1) 樋口陽子、渡邊圭琢、福内友子、山岡法子、安田誠、馬渡健一、中込和哉、金子希代子。尿路結石中のタンパク質がシュウ酸カルシウム-水和物結晶の生成・成長と凝集に与える影響。日本薬学会 第136年会。平成28年3月28日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- (2) 金子希代子、渡邊圭琢、樋口陽子、福内友子、山岡法子。尿路結石 matrix protein の COM 結晶の生成と凝集におよぼす影響。日本尿路結石症学会 第25回 学術集会。平成27年8月29日、ロワジールホテル旭川(北海道、旭川市)
- (3) 金子希代子。『高尿酸血症と食事について』。日本尿路結石症学会 第25回 学術集会。ランチョンセミナー1 『尿路結石ABCシリーズ』。平成27年8月28日、ロワジールホテル旭川(北海道、旭川市)
- (4) 渡邊圭琢、樋口陽子、福内友子、山岡法子、安田誠、馬渡健一、中込和哉、金子希代子。シュウ酸カルシウム-水和物(COM)結晶の生成と凝集に対するタンパク質の影響。第28回バイオメディカル分析科学シンポジウム平成27年8月21-22日、長崎大学薬学部(長崎県長崎市)
- (5) 金子希代子、壁谷瑞穂、近藤弘和、地島宜玄、関戸沙織、安田誠、福内友子、山岡法子、馬渡健一、中込和哉。シュウ酸カルシウム-水和物と尿酸の混合結石の結晶成分分析およびプロテオーム解析。日本尿路結石症学会第24回学術集会。平成26年8月29日、あべのハルカス(大阪府大阪市)
- (6) 壁谷瑞穂、近藤弘和、関戸沙織、地島宜玄、福内友子、山岡法子、安田誠、馬渡健一、中込和哉、金子希代子。シュウ酸カルシウム-水和物と尿酸を成分とする尿路結石のプロテオーム解析。第27回バイオメディカル分析科学シンポジウム平成26年8月20-21日、帝京大学薬学部(東京都板橋区)
- (7) 地島宜玄、金子希代子、松田陽介、森山学、榊田絢子、安田誠、山岡法子、福内友子、宮澤克人、鈴木孝治。炭酸カルシウムとCODから成る尿路結石の結晶成分分析およびプロテオーム解析。日本尿路結石症学会 第23回学術集会。平成25年8月30日、学術総合センター、一橋記念講堂(東京都千代田区)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子希代子 (KANEKO, Kiyoko)
帝京大学・薬学部・教授
研究者番号：90147075

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

山岡法子 (YAMAOKA Noriko)
帝京大学・薬学部・准教授
研究者番号：90582859

福内友子 (FUKUUCHI Tomoko)
帝京大学・薬学部・助教
研究者番号：10389116