

# 尿酸カルシウム結石発生における 尿中高分子物質の作用機序解明に関する研究

A Study for Elucidation of Functional Mechanism of High Molecular Weight Substances in Urine on Calcium Oxalate Stone Formation

課題番号 (12307032)

平成12年度～平成14年度科学研究費補助金  
(基盤研究(A)(1)) 研究成果報告書

平成15年3月  
(March, 2003)

研究代表者 八竹 直

(旭川医科大学・医学部・教授)

The Principal Investigator: Sunao Yachiku, M.D., D.Med.Sci.  
Professor, Asahikawa Medical College

## はしがき

本邦の全国調査による尿路結石症の生涯罹患率（1995年）は、男性では9.0%、女性では3.8%であり、1965年の統計（男性4.3%、女性1.8%）と比較して確実に増加している。将来的にもその罹患率は、増加傾向が続くと予測されており、その対策は急務となっている。

尿路結石症の95%以上を占める上部尿路結石症は、非常に多くの因子が関与していると考えられているため、その成因について総合的、統括的に議論されることは少なかった。そこで、これまで一元的にとらえられがちであった尿路結石症の成因を、よりglobalな視野から検討するために、本研究が計画されるに至った。

上部尿路結石症のうち、カルシウム含有結石は80%以上を占めており、その主要な成分は蓚酸カルシウムであるが、その発生過程の詳細はいまだに明らかになっていない。蓚酸カルシウム結石に関する研究領域では、尿中高分子物質が重要な役割を果たすと考えられており、蓚酸カルシウム結晶の成長や凝集に対する促進因子あるいは抑制因子としての検討や結石関連物質としての様々な蛋白の分離精製や機能解析などが行われてきた。最近では、分子生物学的分析、遺伝子導入、*crystal cell interaction*、予防医学、*evidence based medicine*などの新たな手法や概念が登場しており、尿中高分子物質に関する研究分野が極めて多岐に渡っている。このような現状を踏まえ、本研究の主題を、蓚酸カルシウム結石発生における尿中高分子物質の作用機序解明に関する研究と位置づけ、これらの分野について、すでに多くの実績を有し、本邦のみならず国際的にも評価が高い5施設による共同研究を行った。このように、統括的に尿路結石症の発生原因を解明し、その治療や予防に応用しようとする試みは、本邦で施行される初めての大規模研究であり、国際的にも極めて稀なものである。

本研究の主要テーマとして、1) 細胞結晶の相互作用の検討、2) 結石関連蛋白の分離精製および分子生物学的分析、3) オステオポンチン*antisense*の遺伝子導入、4) *antisense*を用いた尿路結石抑制物質の検討、5) 結石関連蛋白質のmRNA発現コントロールによる結石形成と結石抑制への影響の検討、が立案され、それぞれの分野において専門的な手技を有する施設が分担した。

また本研究領域は、国際的に見ても近年、著しく進歩を遂げており、また欧米との研究競争が盛んな分野でもある。そのため年度途中には全体会議により、年度当初に計画された各研究の進行状況を客観的に評価し、新たな概念や手法の有無、その研究の*variation*や発展性を再確認した。そしてその結果を踏まえて、次年度の計画を立案するという方針で研究を進めた。各年度における研究実施計画と役割分担は、以下の通りである。

## I 平成12年度の研究実施計画と役割分担

- ① 細胞・結晶の相互作用の検討、研究統括：尿酸カルシウム結石形成モデルにおける crystal-cell interactionの検討に適した*in vivo*実験系の確立（旭川医科大学）
- ② 結石関連蛋白の分離精製及び分子生物学的分析（近畿大学）
- ③ オステオポンチン antisense 遺伝子導入：オステオポンチンの antisense 遺伝子導入による結石形成抑制の試みと尿管細胞における発現機構（名古屋市立大学）
- ④ 動物および培養細胞実験、遺伝子導入実験等：Antisenseを用いた尿路結石抑制物質の検討～ヒト heparan sulfate proteoglycan（syndecan-1）発現尿管上皮細胞株の樹立（久留米大学）
- ⑤ 培養細胞遺伝子導入実験、結石関連蛋白の分子生物学的分析：結石関連蛋白質の mRNA 発現コントロールによる結石形成、結石抑制への影響検討～ラット腎におけるプロトンビシ mRNA の発現の確認と発現制御についての検討～（金沢医科大学）

## II 平成13年度の研究実施計画と役割分担

- ① 研究の統括、実験的尿酸カルシウム結石モデルでの crystal-cell interaction の検討（旭川医科大学）
- ② 尿中結石関連蛋白の培養細胞での発現とその機能的検討（近畿大学）
- ③ 実験的尿酸カルシウム結石モデルへの OPN 遺伝子導入と各種サイトカイン、接着分子の検討（名古屋市立大学）
- ④ 培養細胞系における尿酸や尿酸カルシウム結晶による細胞障害の検討（久留米大学）
- ⑤ 結石関連蛋白の mRNA 発現コントロールによる結石形成への影響の検討（金沢医科大学）

## III 平成14年の研究実施計画と役割分担

- ① 細胞結晶間相互作用の検討と研究統括（旭川医科大学）
- ② 結石関連蛋白の分離・精製と分子生物学的分析（近畿大学）
- ③ オステオポンチン antisense 遺伝子導入と各種サイトカインと接着分子との関連の検討（名古屋市立大学）
- ④ 尿管細胞へのヘパラン硫酸遺伝子導入と細胞傷害の検討（久留米大学）
- ⑤ 動物実験系と培養細胞におけるプロトンビシ遺伝子を中心とする結石関連蛋白の分子生物学的分析（金沢医科大学）

## 研究組織

### 研究代表者：

八竹 直 旭川医科大学・医学部・教授

### 研究分担者：

栗田 孝 近畿大学・医学部・教授  
郡 健二郎 名古屋市立大学・医学部・教授  
野田 進士 久留米大学・医学部・教授  
鈴木 孝治 金沢医科大学・医学部・教授

### 研究協力者：

近畿大学 梅川 徹、尼崎直也、辻 秀憲、紺屋英児  
名古屋市立大学 安井孝周、戸澤啓一  
久留米大学 飯田 如、近間秀明、林 篤正  
金沢医科大学 森山 学、宮澤克人  
旭川医科大学 山口 聡、奥山光彦、岩田達也、加藤祐司、安住 誠、  
中園周作、高下紀子

## 交付決定額（配分額）

	直接経費	間接経費	合計
平成12年度	12,200	0	12,200
平成13年度	10,800	3,240	14,040
平成14年度	10,400	3,120	13,520
総計	33,400	6,360	39,760

(金額単位：千円)

## 研究発表

### (1) 学会誌等

#### (2000年, 平成12年)

- Konya E, Tsuji H, Umekawa T, Kurita T, Iguchi M : Effect of ethyl icosapentate on urinary calcium and oxalate excretion. *Int J Urol*, **7**, 361-365, 2000
- Yamate T, Tsuji H, Amasaki N, Iguchi M, Kurita T, Kohri K : Analysis of osteopontin DNA in patients with urolithiasis. *Urol Res*, **28**, 159-166, 2000
- Masuda K, Takahashi N, Tsukamoto Y, Honma H, Kohri K : N-Glycan structures of an osteopontin from human bone. *Biochem Biophys Res Commun*, **268**, 814-817, 2000
- Yasui T, Fujita K, Sakakura T, Tozawa K, Kohri K : Role of osteopontin in the early stages of urolithiasis. Expression of osteopontin antisense RNA inhibits adhesion of calcium oxalate crystals to cultured renal epithelial cells. *BJU Int*, **86** (Suppl), 287, 2000
- Yasui T, Okada A, Senzaki H, Yoshimura M, Kohri K : The effect of Takusha, a Kampo medicine, on renal stone formation and osteopontin expression in a rat urolithiasis model. *BJU Int*, **86** (Suppl), 287, 2000
- 戸澤啓一, 郡 健二郎 : 尿路結石症における代謝系検査. *臨泌*, **54**(4), 49-51, 2000
- 郡 健二郎, 戸澤啓一 : 腎結石の手術適応と食事指導. *日本医事新報*, **3974**, 110-111, 2000

#### (2001年, 平成13年)

- Umekawa T, Iguchi M, Kurita T : The effect of osteopontin immobilized collagen granules in the seed crystal method. *Urol Res*, **29**, 282-286, 2001
- Yasui T, Sato M, Fujita K, Ito Y, Nomura S, Kohri K : Effects of allopurinol on renal stone formation and osteopontin expression in a rat urolithiasis model. *Nephron*, **87**, 170-176, 2001
- Yasui T, Sato M, Fujita K, Tozawa K, Nomura S, Kohri K : Effects of citrate on renal stone formation and osteopontin expression in a rat urolithiasis model. *Urol Res*, **29**, 50-56, 2001
- Yasui T, Fujita K, Tozawa K, Asai K, Soji T, Kato T, Kohri K : Calcium oxalate crystal attachment to cultured rat kidney epithelial cell, NRK-52E. *Urol Int*, **67**, 73-76, 2001
- Yasui T, Tanaka H, Fujita K, Iguchi M, Kohri K : Effects of eicosapentaenoic acid on urinary calcium excretion in calcium stone formers. *Eur Urol*, **39**, 580-585, 2001
- Yasui T, Fujita K, Tozawa K, Kohri K : Osteopontin regulates adhesion of calcium oxalate crystals to renal epithelial cells. *Eurolithiasis -9th European Symposium on Urolithiasis*, 199-200, 2001
- Tozawa K, Yasui T, Ito Y, Kohri K : Signal transduction mediated by focal adhesion kinase (FAK) and the expression of osteopontin in the renal tubular cells : Role in stone formation. *Eurolithiasis - 9th European Symposium on Urolithiasis*, 215-216, 2001
- Kido J, Nakamura T, Asahara Y, Sawa T, Kohri K, Nagata T : Osteopontin in gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res*, **36**, 328-333, 2001

- ・ Moriyama MT, Glenton PA, Khan SR : Expression of inter- $\alpha$  inhibitor related proteins in kidneys and urine of hyperoxaluric rats. *J Urol*, **165**, 1687- 1692, 2001
- ・ 郡 健二郎 : 膀胱・尿道結石. 今日の治療指針, **43**, 506, 2001
- ・ 戸澤啓一, 郡 健二郎 : 尿路結石の成因と病態. ホルモンと臨床, **49**, 9-14, 2001
- ・ 安井孝周, 郡 健二郎 : 腎臓結石. からだの科学, **220**, 74-77, 2001
- ・ 伊藤恭典, 安井孝周, 郡 健二郎 : 尿路結石に対する破砕術. *Medicina*, **38**, 1187-1189, 2001
- ・ 安井孝周, 伊藤恭典, 郡 健二郎 : 尿路結石のマネジメント ~尿路結石の診断・治療・予防法について. *Medicina*, **38**, 1892-1894, 2001

(2002年, 平成14年)

- ・ Umekawa T, Chegini N, Khan SR : Oxalate ions and calcium oxalate crystals stimulate MCP-1 expression by renal epithelial cells. *Kidney Int*, **61**, 105-112, 2002
- ・ Konya E, Amasaki N, Umekawa T, Iguchi M, Kurita T : Influence of urinary sialic acid on calcium oxalate crystal formation. *Urol Int*, **68**, 281-285, 2002
- ・ Yasui T : Kidney stones and eicosapentaenoic acid. *Clinical Pearls News*, **12**, 37-41, 2002
- ・ Yasui T, Fujita K, Asai K, Kohri K : Osteopontin regulates adhesion of calcium oxalate crystals to renal epithelial cells. *Int J Urol*, **9**, 100-109, 2002
- ・ Eguchi Y, Inoue M, Iida S, Matsuoka K, Noda S : Heparan sulfate (HS)/heparan sulfate proteoglycan (HSPG) and bikunin are up-regulated during calcium oxalate nephrolithiasis in rat kidney. *Kurume Med J*, **49**, 99-107, 2002
- ・ Chikama S, Iida S, Inoue M, Kawagoe N, Tomiyasu K, Matsuoka K, Noda S, Takazono I : Role of heparan sulfate proteoglycan (Syndecan-1) on the renal epithelial cells during calcium oxalate monohydrate crystal attachment. *Kurume Med J*, **49**, 201-210, 2002
- ・ Yamaguchi S, Wiessner JH, Hasegawa AT, Hung LY, Mandel GS, Mandel NS : Calcium oxalate monohydrate crystal binding substance produced from Madin-Darby canine kidney cells. *Int J Urol*, **9**, 501-508, 2002
- ・ 鈴木孝治, 森山 学 : 尿路結石症と遺伝子変異. *Urological Today*, **9**, 34-37, 2002
- ・ 山口 聡, 八竹 直 : 尿酸代謝と尿路結石症. 痛風と核酸代謝, **26**, 1-11, 2002
- ・ 山口 聡, 八竹 直 : 女性診療科における主要症候・疾患の薬物療法, 尿路結石症~腎・尿管結石. 産婦人科の実際, **51**, 1597-1604, 2002
- ・ 山口 聡, 八竹 直 : 救急診療ガイドライン, 外来でのトリアージと救急処置, 泌尿器科的腎・尿路疾患, 尿路結石症. 救急・集中治療, **14**, 196-197, 2002
- ・ 山口 聡, 加藤祐司, 高下紀子, 中園周作, 八竹 直, 奥山光彦 : シュウ酸カルシウム結石形成モデルにおける腎集合管細胞でのphosphatidylserine発現の定量的評価とapoptosis pathwayへの関与の検討. 日尿結石誌, **1**, 103-109, 2002

- ・ 加藤祐司, 山口 聡, 高下紀子, 八竹 直, 奥山光彦 : 腎上皮細胞-蓚酸カルシウム結晶相相互作用におけるクエン酸・マグネシウムの効果について. 日尿結石誌, **1**, 90-92, 2002

(2003年, 平成15年)

- ・ Umekawa T, Chegini N, Khan SR : Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by renal epithelial cells in culture on exposure to calcium oxalate, phosphate and uric acid crystals. *Nephrol Dial Transplant*, **18**, 664-669, 2003
- ・ Yamaguchi S, Kato Y, Okuyama M, Kaneko S, Yachiku S, Wiessner JH, Mandel NS : Flowcytometric analysis for phosphatidylserine of the renal collecting duct cell membrane in experimental calcium oxalate nephrolithiasis. *J Urol*, **169** (Suppl), 330, 2003
- ・ 山口 聡, 加藤祐司, 北原克教, 高下紀子, 小野晴子, 八竹 直 : 微小重力環境が尿路結石形成の初期過程に影響を及ぼすか? 第12回短時間無重力利用に関する講演会, 講演論文集, 7-10, 2003
- ・ 加藤祐司, 玉木 岳, 徳光正行, 山口 聡, 八竹 直, 奥山光彦 : 短腸症候群 (short bowel syndrome) に起因した尿路結石症の1例, 本邦報告例の検討. 日泌尿会誌, **94**, 33-36, 2003
- ・ Iida S, Ishimatsu M, Chikama S, Inoue M, Matsuoka K, Akasu T, Noda S, Khan SR : Protective role of heparin/heparan sulfate on oxalate-induced changes in cell morphology and intracellular  $Ca^{2+}$ . *Urol Res*, **31**, 2003, *in printing*
- ・ Okuyama M, Yamaguchi S, Yachiku S : Identification of bikunin isolated from human urine that inhibits calcium oxalate crystal growth and its localization in the kidneys. *Int J Urol*, **10**, 2003, *in printing*
- ・ 山口 聡 : 衝撃波による尿路上皮細胞傷害と尿路結石再発との関連性の検討. 泌尿器外科, **16**, 2003, *in printing*
- ・ Yamaguchi S, Wiessner JH, Hasegawa AT, Hung LY, Mandel GS, Mandel NS : A study of rat model for calcium oxalate crystal formation without severe renal damage. *in submission*
- ・ Kato Y, Yamaguchi S, Yachiku S, Nakazono S, Hori J, Wada N, Hou K : Oral administration of potassium - sodium citrate with magnesium oxide prevents recurrent urolithiasis. *in submission*



## (2) 口頭発表

(2000年, 平成12年)

- ・ Konya E, Umekawa T, Iguchi M, Kurita T : The role of osteopontin on calcium oxalate crystal formation. 9th International Symposium on Urolithiasis (Cape Town, South Africa, February 13 -17, 2000)
- ・ Tozawa K, Fujita K, Yasui T, Senzaki H, Yoshimura M, Sato S, Ito T, Kohri K : Expression of antisense osteopontin and inhibits association of calcium oxalate monohydrate crystals with NRK-52E cells. 9th International Symposium on Urolithiasis (Cape Town, South Africa, February 13 -17, 2000)
- ・ Johnson-Tardieu J, Moriyama MT, Glenton PA, Peck AB, Khan SR : Expression of inter- $\alpha$ -inhibitor related proteins in kidneys and urine of hyperoxaluric rats. 9th International Symposium on Urolithiasis (Cape Town, South Africa, February 13 -17, 2000)
- ・ Moriyama M, Aihara K, Suga K, Shiba N, Miyazawa K, Ikeda R, Suzuki K : Analysis of prothrombin mRNA expression level in the normal and stone forming rat kidneys by competitive real time quantitative PCR. 9th International Symposium on Urolithiasis (Cape Town, South Africa, February 13 -17, 2000)
- ・ Johnson-Tardieu J, Glenton PA, Moriyama MT, Peck AB, Khan SR : Osteopontin expression in kidneys and urine of rats with hyperoxaluria and nephrolithiasis. 9th International Symposium on Urolithiasis (Cape Town, South Africa, February 13 -17, 2000)
- ・ Grover PK, Sallis JD, Miyazawa K, Stapleton A, Ryall RL : Quantification of prothrombin mRNA using competitive polymerase chain reaction. 9th International Symposium on Urolithiasis (Cape Town, South Africa, February 13 -17, 2000)
- ・ Miyazawa K, Suzuki K, Ueda Y, Katsuda S : Demonstration of apoptosis and its related genes in rat renal tubular epithelium of calcium oxalate crystal formation. 9th International Symposium on Urolithiasis (Cape Town, South Africa, February 13 -17, 2000)
- ・ Shiba N, Aihara K, Moriyama M, Suzuki K : Nucleotide sequence of renal prothrombin is different from the liver prothrombin. 9th International Symposium on Urolithiasis (Cape Town, South Africa, February 13 -17, 2000)
- ・ Suzuki K, Aihara K, Shiba N, Moriyama M : Gene expression of prothrombin in human and rat kidney. 9th International Symposium on Urolithiasis (Cape Town, South Africa, February 13 -17, 2000)
- ・ 郡 健二郎 : 脂質代謝異常に伴う尿路結石症の病態～特に分子生物学的解明と遺伝子治療～. 小野医学研究財団, 第11回研究成果発表会 (2000年3月11日, 豊中市)
- ・ Yamaguchi S, Wiessner JH, Hasegawa AT, Hung LY, Mandel GS, Mandel NS : Calcium oxalate monohydrate crystal binding substance produced from Madin-Darby canine kidney cells. 95th Annual Meeting of American Urological Association (Atlanta, USA, May 1-6, 2000)
- ・ 安井孝周, 藤田圭治, 戸澤啓一, 浅井清文, 加藤泰治 : オステオポンチン発現抑制で腎尿細管細胞とシュウ酸カルシウム結晶の接着が抑制される. 第43回日本腎臓学会学術総会 (2000年5月11日-13日, 名古屋市)

- ・ 安井孝周, 藤田圭治, 戸澤啓一, 浅井清文, 加藤泰治, 郡 健二郎 : 尿路結石モデルラットを用いた遺伝子治療の試み～オステオポンチン抑制による結石形成抑制～. 第43回日本腎臓学会学術総会 (2000年5月11日-13日, 名古屋市)
- ・ 安井孝周, 藤田圭治, 戸澤啓一, 郡 健二郎 : 尿路結石モデルラットを用いた遺伝子治療の試み～オステオポンチン制御による結石形成抑制～. 第43回日本腎臓学会学術総会 (2000年5月11日-13日, 名古屋市)
- ・ 安井孝周, 藤田圭治, 戸澤啓一, 加藤泰治 : オステオポンチン発現制御で腎尿細管細胞とシュウ酸カルシウム結晶の接着が抑制される. 第43回日本腎臓学会学術総会 (2000年5月11日-13日, 名古屋市)
- ・ 戸澤啓一, 安井孝周, 線崎博哉, 岡田淳志, 吉村 麦, 上田公介, 郡 健二郎 : オステオポンチンのautocrine mechanism. 第88回日本泌尿器科学会総会 (2000年6月7日-10日, 札幌市)
- ・ 安井孝周, 戸澤啓一, 岡田淳志, 線崎博哉, 吉村 麦, 藤田圭治, 郡 健二郎 ; 結石モデルラット腎では骨基質蛋白 matrixgl protein 遺伝子の発現が亢進している. 第88回日本泌尿器科学会総会 (2000年6月7日-10日, 札幌市)
- ・ 森山 学, 相原衣江, 菅 幸大, 芝 延行, 宮澤克人, 池田龍介, 鈴木孝治 : 過蓆酸尿ラット腎におけるreal time定量PCRを用いたrenal prothrombin mRNAの発現量についての検討. 第88回日本泌尿器科学会総会 (2000年6月7日-10日, 札幌市)
- ・ 安井孝周 : 微少重力環境下における尿路結石の形成機序の解明とその予防, 宇宙環境利用に関する公募. 地上研究, 平成11年度研究成果報告会プログラム (2000年7月28日-29日, 東京都)
- ・ 郡 健二郎 : 歴史から見た21世紀の尿路結石. 第48回徳島県泌尿器科疾患研究会 (2000年8月11日, 徳島市)
- ・ 紺屋英児, 山手貴詔, 尼崎直也, 梶川博司, 加藤良成, 片岡喜代徳, 井口正典, 栗田 孝 : 蓆酸カルシウム結晶形成におけるオステオポンチンの役割について. 第10回日本尿路結石症研究会 (2000年8月31日-9月1日, 大津市)
- ・ 辻 秀憲, 紺屋英児, 尼崎直也, 栗田 孝, 山手貴詔, 加藤良成, 井口正典, 梶川博司, 片岡喜代徳, 杉本賢治 : 上部尿路結石患者における尿中OPN濃度の検討. 第10回日本尿路結石症研究会 (2000年9月1日, 大津市)
- ・ 伊藤恭典, 橋本良博, 安井孝周, 吉村 麦, 線崎博哉, 岡田淳志, 戸澤啓一, 郡 健二郎 : 尿酸結石内に含まれる免疫グロブリン鎖とその意義. 第10回日本尿路結石症研究会学術集会 (2000年8月31日-9月1日, 大津市)
- ・ 郡 健二郎, 井口正典, 西尾俊治, 森本鎮義, 山口 聡 : 尿路結石症再発予防のガイドライン作成に向けて. 第10回日本尿路結石症研究会学術集会 (2000年8月31日-9月1日, 大津市)
- ・ 戸澤啓一, 安井孝周, 吉村 麦, 線崎博哉, 岡田淳志, 藤田圭治, 坂倉 毅, 郡 健二郎 : 腎尿細管細胞内でのオステオポンチン発現におけるシグナル伝達機構の解明と尿路結石形成への関与. 第10回日本尿路結石症研究会学術集会 (2000年8月31日-9月1日, 大津市)

- ・ 芝 延行, 相原衣江, 菅 幸大, 森山 学, 宮澤克人, 池田龍介, 鈴木孝治 : ヒト腎 prothrombin 遺伝子 C10777T 多型性についての検討. 第10回日本尿路結石症研究会 (2000年9月1日, 大津市)
- ・ 相原衣江, 菅 幸大, 森山 学, 芝 延行, 宮澤克人, 池田龍介, 鈴木孝治 : ラット腎組織における prothrombin および bikunin mRNA 発現量の比較. 第10回日本尿路結石症研究会 (2000年9月1日, 大津市)
- ・ 山口 聡, 八竹 直, Wiessner JH, Hasegawa AT, Mandel NS : MDCK細胞が産生するシュウ酸カルシウム結晶を結合させる蛋白の検討. 第10回日本尿路結石症研究会 (2000年9月1日, 大津市)
- ・ 奥山光彦, 北 雅史, 山口 聡, 八竹 直 : Ulinastatinによるヒト尿中シュウ酸カルシウム結晶形成抑制効果の検討. 第10回日本尿路結石症研究会 (2000年9月1日, 大津市)
- ・ 郡 健二郎 : 尿路結石は予防できるか. 第31回県北腎泌尿器疾患研究会 (2000年9月14日, 福島市)
- ・ 郡 健二郎 : 尿路結石の成因と予防法～新たな概念～. 第13回腎とホルモン研究会 (2000年9月30日, 鳥取市)
- ・ Yasui T, Fujita K, Sakakura T, Tozawa K, Kohri K : Role of osteopontin in the early stages of urolithiasis. Expression of osteopontin antisense RNA inhibits adhesion of calcium oxalate crystals to cultured renal epithelial cells. 25th Congress of the Société Internationale d'Urologie (Singapore, October 29-November 2, 2000)
- ・ Yasui T, Okada A, Senzaki H, Yoshimura M, Kohri K : The effect of Takusha, a Kampo medicine, on renal stoneformation and osteopontin expression in a rat urolithiasis model. 25th Congress of the Société Internationale d'Urologie (Singapore, October 29-November 2, 2000)
- ・ Moriyama M, Aihara K, Suga K, Siba N, Miyazawa K, Ikeda R, Suzuki K : Analysis of calcium oxalate (CaOx) crystal proteins mRNA expression level in the rat. 25th Congress of the Société Internationale d'Urologie (Singapore, October 29-November 2, 2000)
- ・ 郡 健二郎 : 尿路結石は予防できるか. 北九州市泌尿器科医会 (2000年11月16日, 北九州市)
- ・ 紺屋英児, 松本成史, 辻 秀憲, 山手貴詔, 尼崎直也, 西岡 伯, 井口正典, 秋山隆弘, 栗田 孝 : 尿酸カルシウム結晶形成におけるオステオポンチンの役割について. 第50回日本泌尿器科学会中部総会 (2000年11月30日-12月2日, 浜松市)
- ・ 安井孝周 : 尿路結石形成におけるオステオポンチンの役割. 第50回日本泌尿器科学会中部総会 (2000年11月30日-12月2日, 浜松市)
- ・ 伊藤恭典, 橋本良博, 安井孝周, 成山泰道, 吉村 麦, 線崎博哉, 岡田敦志, 戸澤啓一, 郡健二郎 : 尿酸結石マトリックスの同定 (免疫グロブリン鎖) とその意義. 第50回日本泌尿器科学会中部総会 (2000年11月30日-12月2日, 浜松市)

(2001年, 平成13年)

- ・ 郡 健二郎 : 腎結石の再発予防ガイドライン. 第23回千葉県腎セミナー (2001年2月16日, 千葉市)
- ・ 紺屋英児, 松本成史, 辻 秀憲, 尼崎直也, 西岡 伯, 梶川博司, 加藤良成, 片岡喜代徳, 井口正典, 秋山隆弘, 栗田 孝 : 蓚酸カルシウム結晶形成における尿中高分子蛋白の役割. 第89回日本泌尿器科学会総会 (2001年4月14日-17日, 神戸市)
- ・ 辻 秀憲, 畑中祐二, 杉本賢治, 紺屋英児, 山手貴詔, 尼崎直也, 栗田 孝, 井口正典 : 結石患者に認められるOPN-DNA polymorphismの検討. 第89回日本泌尿器科学会総会 (2001年4月16日, 神戸市)
- ・ 郡 健二郎 : 温故知新に見る21世紀の尿路結石. 第89回日本泌尿器科学会総会 (2001年4月14日-17日, 神戸市)
- ・ 安井孝周, 伊藤恭典, 戸澤啓一, 金本一洋, 岡田淳志, 線崎博哉, 吉村 麦, 郡 健二郎 : 尿路結石マトリックスオステオポンチンは転写因子CBFA1 (PEBP2  $\alpha$  A) に発現を制御される. 第89回日本泌尿器科学会総会 (2001年4月14日-17日, 神戸市)
- ・ 戸澤啓一, 安井孝周, 伊藤恭典, 吉村 麦, 線崎博哉, 広瀬真仁, 岡田淳志, 郡 健二郎 : 尿路結石形成時における腎尿細管細胞内でのFAKを介したシグナル伝達とオステオポンチン発現. 第89回日本泌尿器科学会総会 (2001年4月14日-17日, 神戸市)
- ・ 伊藤恭典, 安井孝周, 岡田淳志, 線崎博哉, 吉村 麦, 戸澤啓一, 郡 健二郎 : 緑茶による結石形成制御効果. 第89回日本泌尿器科学会総会 (2001年4月14日-17日, 神戸市)
- ・ 線崎博哉, 安井孝周, 伊藤恭典, 伊藤尊一郎, 津ヶ谷正行, 戸澤啓一, 郡 健二郎 : ビスフォスフォネートの尿路結石形成抑制効果の検討. 第89回日本泌尿器科学会総会 (2001年4月14日-17日, 神戸市)
- ・ 江口善朗, 井上通朗, 松尾光哲, 飯田 如, 松岡 啓, 野田進士 : 蓚酸カルシウム結石形成ラット腎臓におけるBikuninおよびHSPG (syndecan) の発現について. 第89回日本泌尿器科学会総会 (2001年4月15日, 神戸市)
- ・ 飯田 如, 石松 秀, 井上通朗, 富安克郎, 近間秀朗, 川越伸俊, 宗像良和, 松岡 哲, 野田進士 : 尿細管上皮細胞における細胞内カルシウム変化に関する検討. 第89回日本泌尿器科学会総会 (2001年4月15日, 神戸市)
- ・ 山口 聡, 奥山光彦, 八竹 直, Wiessner JH, Hasegawa AT, Mandel NS : 蓚酸カルシウム結石形成における細胞-結晶間相互作用の*in vivo*実験に適したモデルの検討. 第89回日本泌尿器科学会総会 (2001年4月15日, 神戸市)
- ・ 奥山光彦, 玉木 岳, 北 雅史, 山口 聡, 金子茂男, 八竹 直, 森川 満 : Ulinastatinによるヒト尿中シュウ酸カルシウム結晶形成抑制効果の解析. 第89回日本泌尿器科学会総会 (2001年4月15日, 神戸市)
- ・ 郡 健二郎 : 尿路結石の成因と再発予防. 第15回浜松内科泌尿器科研究会 (2001年5月11日, 浜松市)

- ・ 伊藤恭典, 安井孝周, 戸澤啓一, 岡田淳志, 線崎博哉, 吉村 麦, 郡 健二郎 : 緑茶投与によるラット腎結石形成抑制効果. 第44回日本腎臓学会学術総会 (2001年5月27日-29日, 東京都)
- ・ 安井孝周, 伊藤恭典, 戸澤啓一, 郡 健二郎 : 尿路結石マトリクス・オステオポンチンは転写因子CBFA1に発現を制御される. 第44回日本腎臓学会学術総会 (2001年5月27日-29日, 東京都)
- ・ Iida S, Ishimasu M, Chikama S, Inoue M, Matsuoka K, Akasu T, Noda S : Changes in intracellular  $Ca^{2+}$  in renal tubular epithelial cells during oxalate exposure. 96th Annual Meeting of American Urological Association (Anahaim, USA, June 2-7, 2001)
- ・ 郡 健二郎 : 尿路結石の成因と再発予防～最近の話題～. 第28回秋田県泌尿器科集談会 (2001年6月30日, 秋田市)
- ・ 郡 健二郎 : 歴史からみた21世紀の尿路結石の成因と再発予防. 第14回広島腎疾患研究会 (2001年7月26日, 広島市)
- ・ 辻 秀憲, 畑中祐口, 紺屋英児, 尼崎直也, 栗田 孝, 杉本賢治, 井口正典, 山手貴詔 : 結石患者に認められるOPN-DNA polymorphismの成因の検討. 第11回日本尿路結石症研究会 (2001年8月31日, 宝塚市)
- ・ 伊藤恭典, 安井孝周, 戸澤啓一, 岡田淳志, 線崎博哉, 吉村 麦, 郡 健二郎 : 緑茶による腎結石抑制効果とその作用機序. 第11回日本尿路結石症研究会 (2001年8月30日-31日, 宝塚市)
- ・ 線崎博哉, 安井孝周, 伊藤恭典, 伊藤尊一郎, 津ヶ谷正行, 戸澤啓一, 郡 健二郎 : ビスホスホネートの尿路結石形成抑制効果の検討. 第11回日本尿路結石症研究会 (2001年8月30日-31日, 宝塚市)
- ・ 相原衣江, 百成智津枝, 森山 学, 宮澤克人, 池田龍介, 鈴木孝治 : 人尿細管培養細胞を用いた尿路結石関連蛋白質の発現についての検討. 第11回日本尿路結石症研究会 (2001年8月31日, 宝塚市)
- ・ 森山 学, 百成智津枝, 相原衣江, 宮澤克人, 池田龍介, 鈴木孝治 : 蓚酸による腎尿細管細胞障害における活性酸素発生部位に関する検討. 第11回日本尿路結石症研究会 (2001年8月31日, 宝塚市)
- ・ 山口 聡, 加藤祐司, 八竹 直, 奥山光彦, Wiessner JH, Hasegawa AT, Mandel NS : Crystal-cell interactionの*in vivo*実験に適した蓚酸カルシウム結石実験モデルの検討. 第11回日本尿路結石症研究会 (2001年8月31日, 宝塚市)
- ・ 加藤祐司, 山口 聡, 八竹 直, 吉原秀樹, 奥山光彦 : マグネシウム製剤による尿中結石関連物質の健常者での検討. 第11回日本尿路結石症研究会 (2001年8月31日, 宝塚市)
- ・ Yasui T, Fujita K, Tozawa K, Kohri K : Osteopontin regulates adhesion of calcium oxalate crystals to renal epithelial cells. 9th European Symposium on Urolithiasis (Rotterdam, Netherland, September 13-15, 2001)
- ・ Tozawa K, Yasui T, Ito Y, Kohri K : Signal transduction mediated by focal adhesion kinase (FAK) and the expression of osteopontin in the renal tubular cells : Role in stone formation. 9th European Symposium on Urolithiasis (Rotterdam, Netherland, September 13-15, 2001)

- ・ 辻 秀憲, 畑中祐二, 杉本賢治, 紺屋英児, 尼崎直也, 梅川 徹, 井口正典, 栗田 孝 : Analysis of osteopontin DNA and relationship with concentration of osteopontin in urine in urolithiasis patient. 18th Korea-Japan Urological Congress (Seoul, Korea, September 15, 2001)
- ・ Okada A, Yoshimura M, Yasui T, Tatsura H, Azemoto M, Ando Y, Ueda K, Kohri K : Parameters for determining urinary calculi that resist fragmentation by extracorporeal shock wave lithotripsy alone. 18th Korea-Japan Urological Congress (Seoul, Korea, September 14-15, 2001)
- ・ Kohri K, Terai A : Epidemiology of urinary stones. 18th Korea-Japan Urological Congress (Seoul, Korea, September 14-15, 2001)
- ・ Moriyama M, Domiki C, Aihara K, Miyazawa K, Ikeda R, Suzuki K : Localization of superoxide in oxalate-associated injury to HK-II cells. 18th Korea-Japan Urological Congress (Seoul, Korea, September 14-15, 2001)
- ・ 加藤祐司, 山口 聡, 岩田達也, 玉木 岳, 八竹 直, 川上憲裕, 倉 達彦: マグネシウム製剤投与による尿中結石関連諸物質の変化の検討. 第353回日本泌尿器科学会北海道地方会 (2001年9月22日, 旭川市)
- ・ 加藤祐司, 山口 聡, 岩田達也, 八竹 直, 奥山光彦, 倉 達彦, 国枝 学, 小山内裕昭 : マグネシウム製剤投与による尿中結石関連諸物質の変化の検討. 第66回日本泌尿器科学会東部総会 (2001年10月11日, 東京都)
- ・ 安井孝周, 伊藤恭典, 戸澤啓一, 岡田淳志, 線崎博哉, 吉村 麦, 遠藤純央, 小林隆宏, 成山泰道, 郡 健二郎 : 尿路結石マトリクス・オステオポンチンは転写因子RUNX2に発現を制御される. 第51回日本泌尿器科学会中部総会 (2001年11月14日-16日, 大阪府)
- ・ 森山 学, 百成智津枝, 相原衣江, 宮澤克人, 池田龍介, 鈴木孝治 : 蓚酸による腎尿細管細胞障害における活性酸素発生部位に関する検討. 第51回日本泌尿器科学会中部総会 (2001年11月14日-16日, 大阪府)

#### (2002年, 平成14年)

- ・ 伊藤恭典, 安井孝周, 西原恵司, 広瀬真仁, 小林隆宏, 岡田淳志, 線崎博哉, 吉村 麦, 戸澤啓一, 郡 健二郎 : 緑茶の抗酸化作用による腎結石形成抑制効果. 第90回日本泌尿器科学会総会 (2002年4月17日-20日, 東京都)
- ・ 線崎博哉, 安井孝周, 伊藤恭典, 伊藤尊一郎, 津ヶ谷正行, 戸澤啓一, 郡 健二郎 : 第2, 第3世代Bisphosphonateにおけるリン酸カルシウム形成抑制効果の比較. 第90回日本泌尿器科学会総会 (2002年4月17日-20日, 東京都)
- ・ 飯田 如, 石松 秀, 斎藤孝二郎, 近間秀朗, 井上通朗, 松尾光哲, 富安克郎, 松岡 哲, 赤須 崇, 野田進士 : ラット腎尿細管上皮細胞における sulfate/oxalate-bicarbonate exchanger (Sat-1) mRNAの発現に関する検討. 第90回日本泌尿器科学会総会 (2002年4月16日, 東京都)
- ・ 飯田 如, 近間秀朗, 石松 秀, 川越伸俊, 井上通朗, 松尾光哲, 富安克郎, 松岡 哲, 赤須 崇, 野田進士 : 蓚酸カルシウム結石形成過程におけるheparan sulfate (HS) およびHSPG (syndecan-1) の機能解析. 第90回日本泌尿器科学会総会 (2002年4月16日, 東京都)



- ・ 近間秀朗, 飯田 如, 井上通朗, 川越伸俊, 松尾光哲, 富安克郎, 松岡 哲, 野田進士, 高園磯子, 石松 秀, 赤須 崇 : HSPG (syndecan-1) 発現腎尿管上皮細胞の樹立, 及びその構造解析. 第90回日本泌尿器科学会総会 (2002年4月16日, 東京都)
- ・ 山口 聡, 加藤祐司, 高下紀子, 和田直樹, 八竹 直, 奥山光彦 : シュウ酸カルシウム結石形成モデルにおける腎集合管細胞でのphosphatidylserine発現とその定量的評価の検討. 第90回日本泌尿器科学会総会 (2002年4月16日, 東京都)
- ・ 加藤祐司, 山口 聡, 高下紀子, 岩田達也, 八竹 直, 奥山光彦, 西原正幸 : 腎上皮細胞-蓚酸カルシウム結晶相互作用におけるクエン酸・マグネシウムの効果について. 第90回日本泌尿器科学会総会 (2002年4月18日, 東京都)
- ・ 伊藤恭典, 安井孝周, 吉村 麦, 線崎博哉, 岡田淳志, 広瀬真仁, 戸澤啓一, 郡 健二郎 : 尿路結石症における抗酸化作用および酸化ストレスによるアポトーシスの検討. 第12回日本尿路結石症研究会 (2002年8月30日-31日, 旭川市)
- ・ 宮澤克人, 百成智津枝, 森山 学, 池田龍介, 鈴木孝治 : CaOx結晶による腎尿管細胞の遺伝子発現について~DNAマクロアレイによる解析~. 第12回日本尿路結石症研究会 (2002年8月30日, 旭川市)
- ・ 加藤祐司, 山口 聡, 高下紀子, 岩田達也, 八竹 直, 奥山光彦 : 腎上皮細胞-蓚酸カルシウム結晶相互作用におけるクエン酸・マグネシウムの効果について. 日本尿路結石症学会第12回学術集会 (2002年8月30日, 旭川市)
- ・ 山口 聡, 加藤祐司, 高下紀子, 中園周作, 八竹 直, 奥山光彦 : シュウ酸カルシウム結石形成モデルにおける腎集合管細胞でのphosphatidylserine発現の定量的評価とapoptosis pathwayへの関与の検討. 日本尿路結石症学会第12回学術集会 (2002年8月30日, 旭川市)
- ・ Itoh Y, Yasui T, Tozawa K, Okada A, Senzaki H, Yoshimura M, Kohri K : Inhibitory effects of green tea on renal stone formation. 26th Congress of the Société Internationale d'Urologie (Stockholm, Sweden, September 8-12 2002)
- ・ Iida S, Chikama S, Ishimatsu M, Inoue M, Matsuoka K, Noda S, Khan SR : Role of heparin sulfate on cultured renal epithelial cells during oxalate exposure. 26th Congress of the Société Internationale d'Urologie (Stockholm, Sweden, September 8-12 2002)
- ・ 山口 聡 : 衝撃波による尿路上皮細胞傷害と尿路結石再発との関連性の検討. 第67回日本泌尿器科学会東部総会 (2002年9月20日, 東京都)
- ・ 山口 聡 : 衝撃波による尿路上皮細胞傷害と衝撃波がcrystal-cell interactionにおよぼす影響の検討. 第67回日本泌尿器科学会東部総会 (2002年9月20日, 東京都)
- ・ 郡 健二郎 : 尿路結石診療のコツと落とし穴. 第32回日本腎臓学会西部学術大会 (2002年10月4日-6日, 和歌山市)
- ・ 郡 健二郎 : ガイドラインから見た尿路結石の再発予防. 岐阜泌尿器科医会第43回例会 (2002年11月10日, 岐阜市)
- ・ 吉村 麦, 坂倉 毅, 本間秀樹, 線崎博哉, 多和田俊保, 藤田圭治, 伊藤恭典, 安井孝周, 戸澤啓一, 郡 健二郎 : 健康人における猪骨湯投与による血液, 尿化学への影響. 第52回日本泌尿器科学会中部総会 (2002年11月14日-16日, 名古屋市)

(2003年, 平成15年)

- ・ 山口 聡 : MicrogravityがCrystal-cell interactionに及ぼす影響～地下無重力実験センターにおける検討. 第3回ウィンターリサーチカンファレンス (2003年1月10日, 旭川市)
- ・ 山口 聡, 加藤祐司, 北原克教, 高下紀子, 小野晴子, 八竹 直 : 微小重力環境が尿路結石形成の初期過程に影響を及ぼすか? 第12回短時間無重力利用に関する講演会 (2003年3月5日, 札幌市)
- ・ 山口 聡, 八竹 直 : 尿路結石形成の初期段階にかかわるcrystal-cell interactionの*in vivo*実験とその応用. 第91回日本泌尿器科学会総会 (2003年4月5日, 徳島市)
- ・ Yamaguchi S, Kato Y, Okuyama M, Kaneko S, Yachiku S, Wiessner JH, Mandel NS : Flowcytometric analysis for phosphatidylserine of the renal collecting duct cell membrane in experimental calcium oxalate nephrolithiasis. 98th Annual Meeting of American Urological Association (Chicago, USA, April 27-May 1, 2003)

(3) 出版物

- ・ ガイドライン作成委員会 : 荒川 孝, 五十嵐辰男, 井口正典, 伊藤晴夫, 小川由英, 金村三樹郎, 守殿貞夫, 郡 健二郎, 棚橋善克, 丹田 均, 寺井章人, 西尾俊治, 奴田原紀久雄, 秦野 直, 東原英二, 東 義人, 平尾佳彦, 間宮良美, 麦谷荘一, 村井 勝, 森本鎮義, 八竹 直, 山口秋人, 山口 聡 : 尿路結石症診療ガイドライン (日本泌尿器科学会, 日本Endourology・ESWL学会, 日本尿路結石症学会編), 金原出版, 東京, 2002



## 研究成果

前述したように、本研究領域は、国際競争が盛んに行われ、短期間に新たな概念が登場したり、その分析手技などが著しく進歩する傾向にある。そのため年度途中には、研究代表者、分担研究者、研究協力者が全体会議を開催し、分担された研究ごとに研究成果が発表され、それらの結果の問題点や次年度の目標について議論を行った。また最終年度には、研究の発展性や今後の展望についての再確認が行われた。それぞれの年度について発表、討論された内容は以下の通りである。

【平成12年度（第1回研究成果発表会）】

平成12年11月18日、旭川医科大学機器センター会議室

1. 結石関連蛋白の分離精製及び分子生物学的分析  
(近畿大学) 尼崎直也
2. オステオポンチンのantisense遺伝子導入による結石形成抑制の試みと  
尿細管細胞における発現機構  
(名古屋市立大学) 安井孝周
3. Antisenseを用いた尿路結石抑制物質の検討  
～ヒトheparansulfate proteoglycan (syndecan-1) 発現腎尿細管上皮細胞株の樹立～  
(久留米大学) 飯田 如
4. 結石関連蛋白質のmRNA発現コントロールによる結石形成、結石抑制  
への影響検討  
～ラット腎におけるprothrombin mRNAの発現の確認と発現制御についての  
検討～  
(金沢医科大学) 森山 学
5. 細胞・結晶の相互作用の検討  
～蔞酸カルシウム結石形成モデルにおけるcrystal-cell interactionの検討に  
適した*in vivo*実験系の確立～  
(旭川医科大学) 山口 聡

## 結石関連蛋白の分離精製及び分子生物学的分析

近畿大学 医学部 泌尿器科

尼崎直也、紺屋英児、栗田 孝

### 【目的】

尿路結石形成機序に関わる有機成分として、最近種々の蛋白成分が報告されている。例えばオステオポンチン (osteopontin ; OPN) ・ネフロカルシン・カルプロテクチン・ $\alpha$ 2HS糖蛋白・プロトロンビンなどである。現在世界的には、試験管内の実験系であるシードクリスタル法・全尿法などにより蓚酸カルシウム結晶の凝集・成長を分析する方法の他に強制的にヒトの尿中に結晶を形成させて、この中に含まれる蛋白であるCrystal Matrix Protein (CMP) を分析する方法などが主流である。しかし生体内での結石形成と前述の実験系はかなりの差異があり、このように非生理的条件下にて結晶に付随させた蛋白が、実際にヒトの結石の発生にも関わっているとは必ずしも言えない。これらの蛋白をコラーゲン基質上に固定させて、いわゆる固相上の蛋白が蓚酸カルシウム結晶の凝集・成長に与える影響を評価するというより生体に近い実験系の開発により、各種の尿路結石関連蛋白を再評価することを目的とする。

### 【方法】

- (1) OPN・ネフロカルシン・カルプロテクチン等の各種尿路結石関連蛋白を精製する。
- (2) より生体に近い実験系として、コラーゲンやフィブロネクチン等の基質に上記の蛋白を付着させて、これを材料にしたシードクリスタル法により蓚酸カルシウム結晶の凝集・成長に与える影響を調べる。

### 【結果】

- (1) OPNとカルプロテクチンの精製は完了している。
- (2) OPNはコラーゲン顆粒を用いたシードクリスタル法において蓚酸カルシウム結晶の凝集・成長を促進する作用が認められている。

## オステオポンチンの antisense 遺伝子導入による結石形成抑制の試み と尿管細胞における発現機構

名古屋市立大学 医学部 泌尿器科

安井孝周、郡 健二郎

私達は尿路結石の有機成分（マトリクス）としてオステオポンチン（OPN）を同定し、結石形成時に尿管細胞で発現が増加していること、結石抑制物質の投与で発現が抑制されることを報告してきた。今回、結石モデルラット腎でOPNの発現を制御することにより結石形成抑制を試みた。

OPN遺伝子を発現ベクターpRc/CMVとpTet-spliceに翻訳方向と逆向きに挿入したpTet-OPNasとpRc/CMV-OPNasを作成した。7週齢SDラットにグリオキシル酸20mg/kgを連日投与し、結石モデルラットとした。pTet-OPNas導入群、pRc/CMV-OPNas導入群、ネガティブコントロールとしてpRc/CMV導入群を設定し、発現ベクターとリポフェクション試薬の混合液を両腎に局注した。14日後に腎臓を摘出し、OPNの発現、CaOxプラーク形成を検討した。

コントロールベクターを導入した腎ではCaOxプラークが形成されたが、OPN antisenseの遺伝子導入によりOPN発現とCaOxプラーク形成が抑制された。OPNは結石形成に重要な物質であり、遺伝子治療の標的遺伝子となりうる可能性が示唆された。

また、尿管細胞内でのOPN発現機構を調べるため、尿管培養細胞（MDCK細胞）にOPNとビトロネクチンを添加し、細胞内のFocal adhesion kinase（FAK）のリン酸化の程度とOPNの発現を検討した。また、OPNの発現を制御する転写因子についても解明されていない。骨組織においてOPNと転写因子CBFA1（PEBP2  $\alpha$  A）のmRNA発現部位が同一部位であること、CBFA1のノックアウトマウスでOPN mRNA発現が顕著に低下していることからOPN遺伝子の発現はCBFA1に制御されていることが推察される。CBFA1がOPN遺伝子のプロモーターとして作用しているかをルシフェラーゼアッセイにて検討しエチレングリコールを溶媒とした結石モデルラット腎で、OPNとCBFA1について*in situ hybridization*を行った。CBFA1はOPNの上流部位に結合し転写をpromoteしていることが示唆された。

## Antisense を用いた尿路結石抑制物質の検討

～ヒト heparan sulfate proteoglycan (syndecan-1) 発現腎尿管上皮細胞株の樹立～

久留米大学 医学部 泌尿器科

飯田 如、井上通朗、近間秀明、川越伸俊、野田進士

### 【背景】

これまでにわれわれは、ラット結石形成モデルを用いて heparan sulfate (HS) およびその生体内でのリガンドである heparan sulfate proteoglycan (HSPG、syndecan) の発現が、腎臓において亢進していることを報告してきた。今回われわれは、ヒト由来の syndecan-1 遺伝子を以前より結石研究に用いられている MDCK 細胞に導入し、新しい細胞株を樹立して実験を行うことにした。

### 【対象および方法】

ヒト前立腺癌細胞株 (LNCaP) からのヒト syndecan-1 cDNA のクローニングを行い、蛋白発現ベクターに組みこんだ後、MDCK 細胞に遺伝子導入した。

### 【結果】

RT-PCRにて human Syndecan-1 gene の発現を、KIC-synd-1 cells、LNCaP、ヒト腎組織 (normal & RCC) にて認めた。一方 MDCK 細胞では、発現を認めなかった。MAb を用いた免疫染色では、KIC-synd-1 cells において、細胞間の接合部付近および表面を中心に陽性像を示し、Western blotting にても同様の結果であった。HPLC を用いて、syndecan-1 の糖鎖である HS の構造について検討を加えた結果、wild type、KIC-synd-1 cells とともに  $\Delta$ DiHS-0S と  $\Delta$ DiHS-NS の2種類が存在する事がわかった。また、KIC-synd-1 cells の方により多くの硫酸基が含まれていた。この結果は、KIC-synd-1 cells の方がマイナスチャージが強くなる事を示唆しており、カルシウムとの親和性に何らかの影響をもつことが考えられる。さらに形態学的変化を調べるため、走査電子顕微鏡にて細胞表面を観察したが、特に両者に有意な違いは認めなかった。また、KIC-synd-1 cells に対してアンチセンスを導入し、その細胞内分布を蛍光顕微鏡にて調べた結果、細胞質内および核内に存在していることがわかった。

### 【まとめ】

今回、ヒト syndecan-1 を発現する MDCK 細胞を樹立した。この細胞株を用いることにより、今後尿酸カルシウム結石形成過程における crystal-cell interaction に対して、HSPG がどのような役割を担うのか検討できるものと思われる。

## ラット腎におけるprothrombin mRNAの発現の確認と発現制御についての検討

金沢医科大学 医学部 泌尿器科

森山 学、鈴木孝治

### 【背景】

尿酸カルシウム結晶より抽出されたCMPのアミノ酸配列の確認の結果その蛋白質はprothrombinのactivation peptide fragment 1と相同性があることが確認された。またその高分子物質自身*in vitro*では尿酸カルシウム結晶の強い凝集阻止能を持つことが確認されており、ヒト腎組織の免疫染色の結果ひろく尿細管の細胞質に染色されることが確認された、以上のことよりprothrombin（ここでは肝臓由来の本来のprothrombinと区別するため腎由来prothrombin F1；RPTF-1と呼ぶ）は何らかの形で腎尿細管細胞より発現し尿中尿酸カルシウム結晶と結合しその凝集成長を抑制している可能性が示唆された。

### 【目的】

今回我々は、そのRPTF-1が実際に腎結石形成過程において腎尿細管から発現しその発現量が尿酸カルシウム結晶の影響によって調節されているかを確認するためにも結石形成動物（ラット）モデルを用いて検討することとした。

### 【方法】

mRNAの確認は一般的なAGPC法に従いtRNAを抽出し今回はそのままRT-PCRを行いcDNAを作成し電気泳動を用いて目的のPCR産物であることを確認した。

### 【結果】

ラット腎より抽出されたRNAからRPTF-1のmRNAの発現が確認された。また結石形成ラットにおいてその発現強度に変化が見られることが確認された。

### 【考察】

今回の結果ではprothrombinは正常での発現が少なく結石形成時に強く増強しており実験動物群間での有意差が得られた。今後は検討する物質の数を増やすと共に各々の物質の相互関係の解明を目的としたfunctional assayを予定している。

## 細胞・結晶の相互作用の検討

### ～尿酸カルシウム結石形成モデルにおけるcrystal-cell interactionの検討に適した *in vivo* 実験系の確立～

旭川医科大学 医学部 泌尿器科

山口 聡、奥山光彦、安住 誠、八竹 直

#### 【目的】

尿酸カルシウム結石形成の初期段階において、尿酸カルシウム結晶と腎上皮細胞の *interaction* は重要な因子の一つである。その検討は、主に培養細胞を用いた *in vitro* 実験を中心に行われ、多くの知見が得られているが、*in vivo* 実験系においても、これらの結果を検証する必要性が生じてきた。従来、一般に多く用いられてきた尿酸カルシウム結石形成モデルは、腎機能障害が必発かつ腎上皮細胞にも高度なダメージが加わるため、*crystal-cell interaction* のような微細な実験には適していないと考えられる。われわれは、これらの実験系を見直し、尿酸カルシウム結晶と腎上皮細胞の相互作用を検討するに相応しい条件について検討した。

#### 【方法】

6週齢、雄性SDラットに対し、以下の条件の溶液を自由摂水させた。

実験1；Ethylene Glycol (EG) +1% NH<sub>4</sub>Cl、実験2；EG単独とし（EG濃度は、各々の実験で0.1、0.2、0.4、0.8 vol.%の4群を設定）、それぞれ投与期間別に、各種尿・血液生化学検査、尿中尿酸カルシウム結晶と腎組織内尿酸カルシウム結晶の沈着について検討した。

#### 【結果】

実験1；EG濃度と投与期間に依存して、尿中尿酸排泄量、尿酸カルシウム結晶形成と腎組織内尿酸カルシウムの沈着は増加、平行して腎機能障害および尿細管障害が進行していた。

実験2；実験1に比し、尿酸カルシウム結晶形成と腎組織内尿酸カルシウムの沈着は少なかったが、腎尿細管障害はほとんど認めなかった。

#### 【考察】

従来の実験系を、*modify*することにより、腎障害を最小限に抑制し、かつ尿酸カルシウムの結晶尿のみが惹起される条件の設定は可能と考えられた。さらに実験系の種類によっては、尿路上皮に異なる種類の結晶を曝露させることも可能かも知れない。これらに応用すると、*in vivo* 実験においても、*in vitro* での *crystal-cell interaction* に関する実験結果は、再現あるいは追試が可能と思われる。

【平成13年度（第2回研究成果発表会）】

平成13年12月1日、旭川医科大学機器センター会議室

1. 結石関連蛋白の分離精製及び分子生物学的分析  
(近畿大学) 紺屋英児
2. 蓚酸カルシウム結石発生における尿中高分子物質の作用機序解明に  
関する研究  
～オステオポンチンの発現機構と結石形成について～  
(名古屋市立大学) 安井孝周
3. 蓚酸カルシウム結石形成過程における高分子抑制物質heparan sulfateの  
機能解析  
～腎尿細管上皮細胞を用いた細胞内カルシウムイオンの変化に対する影響～  
(久留米大学) 飯田 如
4. ヒト近位尿細管細胞における結石関連蛋白の発現について  
(金沢医科大学) 森山 学
5. 蓚酸カルシウム結石形成モデルにおける腎集合管細胞での  
phosphatidylserine発現とその定量的評価  
(旭川医科大学) 山口 聡



## 結石関連蛋白の分離・精製と分子生物学的分析

近畿大学 医学部 泌尿器科

紺屋英児、辻 秀憲、栗田 孝

Madine Darby Canine Kidney細胞 (MDCK細胞) 表面にOPNを付着させてMDCK細胞へのCaOx結晶の付着度を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。関連物質として、Thrombin、Arg-Gly-Aspペプチド (以下RGD)、Arg-Gly-Gluペプチド (以下RGE) とヒトの母乳より精製したOPNの計4種類の物質を使用して、<sup>45</sup>Ca量を測定、結晶の付着状況をSEMで確認した。関連物質を投与していない対象例は細胞表面への結晶の付着が認められた。thrombin投与例では対象例に比べると明らかに結晶付着量の減少を認めた。RGD、RGE投与例は対象例と比べて特に差を認めなかった。OPN投与例では他の群と比べて結晶付着量が増加していた。次に各群のCa濃度を測定した。対象例に比べて有意にthrombin投与例においてCa濃度の低下を認めた。OPN投与例では対象例と比べて有意差はなかったがCa濃度の増加がみられた。RGD、RGE投与例と対象例との間では差は認めなかった。以上のようにMDCK細胞へのCaOx結晶の付着はOPNによって促進されることが明らかとなり、OPNは結石形成過程の促進因子として重要であることが推察された。次に、アンチセンス法を用いて特異的に細胞内でのOPN合成の阻害を試みた。OPNに対するantisense oligonucleotideを作成して、まずantisense oligonucleotide添加でOPNが抑制、阻害されているかを蛍光抗体法で確認した。次にantisense oligonucleotide添加による結晶沈着程度を、<sup>45</sup>Ca量の測定ならびにSEMで確認した。細胞内OPNは、antisense oligonucleotide 27  $\mu$  Mの濃度で細胞内のOPNを十分に阻害していた。次に<sup>45</sup>Ca量を測定したところantisense oligonucleotide投与群では23.4  $\pm$  7.3%と<sup>45</sup>Ca量が減少し、control、DOTAP、sense群と比較して明らかに差を認めた。次にSEMを行ったところantisense群では27  $\mu$  Mの濃度でその他の群に比べて個々の細胞での結晶はやや減少しているように確認された。今回の検討から、結石形成初期の結晶付着機序でその接着的な役割を担っているマトリックスとしてOPNが主因を占めていることが推察された。以上のようにMDCK細胞へのCaOx結晶の付着はOPN蛋白によって促進されることが明らかとなり、またそれはthrombinやantisense oligonucleotideにより阻害されることも明らかとなった。

蔘酸カルシウム結石発生における尿中高分子物質の作用機序解明に関する研究  
～オステオポンチンの発現機構と結石形成について～

名古屋市立大学 医学部 泌尿器科

安井孝周、郡 健二郎

私達は尿路結石の有機成分（マトリクス）としてオステオポンチン（OPN）を同定し、結石形成時に腎尿細管細胞で発現が増加していること、結石抑制物質の投与で発現が抑制されることを報告してきた。培養尿細管細胞でOPNの発現を抑制することによって蔘酸カルシウム結晶と細胞の接着が阻害されることを示し、結石モデルラット腎でOPNの発現を制御することにより結石形成の抑制を示した。OPNは結石形成に重要な物質であり、遺伝子治療の標的遺伝子となりうる可能性が示唆され、OPN発現機構の解明が必要と考えた。

Focal adhesion kinase（FAK）は接着斑リン酸化酵素で、腎尿細管細胞でもインテグリンとOPNの接着に伴いFAK、細胞骨格蛋白などがチロシンリン酸化を受け、細胞内に情報伝達がなされ、遺伝子発現が制御されている。OPNもこの系よる制御を受けていると考えた。腎尿細管細胞内でのOPN発現機構を調べるため、尿細管培養細胞（MDCK細胞、NRK細胞）にOPNとビトロネクチンを添加し、細胞内のFocal adhesion kinase（FAK）のリン酸化とOPNの発現を検討した。刺激（添加）したOPN蛋白濃度に依存してOPNの発現が増加した。このとき、FAKのリン酸化が進んでおり、OPNによるFAKを介したOPNの自己分泌機構が関与している可能性が示唆された。また、OPNの発現を制御する転写因子について検討した。骨組織においてOPNと転写因子RUNX2（CBFA1、EBP2 $\alpha$ A）のmRNA発現部位が同一部位であること、RUNX2のノックアウトマウスでOPN mRNA発現が顕著に低下していることからRUNX2がOPN発現を制御している可能性が示唆される。RUNX2がOPN遺伝子のプロモーターとして作用しているかをルシフェラーゼアッセイにて検討しエチレングリコールを負荷した結石モデルラット腎で、OPNとRUNX2について*in situ hybridization*を行った。RUNX2はOPNの上流部位に結合し転写をpromoteしていることが示唆された。

今後は発現機構の解明からOPN発現制御を可能にしたい。

## 硫酸カルシウム結石形成過程における高分子抑制物質 heparan sulfate の機能解析

～腎尿細管上皮細胞を用いた細胞内カルシウムイオンの変化に対する影響～

久留米大学 医学部 泌尿器科学教室<sup>1)</sup>

同 第2生理学教室<sup>2)</sup> 同 化学教室<sup>3)</sup>

飯田 如<sup>1)</sup>、石松 秀<sup>2)</sup>、近間秀明<sup>1)</sup>、井上通朗<sup>1)</sup>、  
川越伸俊<sup>1)</sup>、野田進士<sup>1)</sup>、高園磯子<sup>3)</sup>

**【背景】** 以前よりHSの結石形成過程における役割は、主に結晶凝集や成長過程における阻害作用にあると報告されている。近年結石形成過程で、crystal-cell interactionの重要性が指摘され、さらにこの現象は硫酸による細胞傷害が密接に関与しているとの報告がなされている。一般的に、細胞傷害により細胞内カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) が変化することが知られているが、硫酸による細胞傷害に関しての細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ に関する詳細な報告は無い。そこで今回我々は、HSの細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の変化に対する効果を検討し同時に硫酸カルシウム結石形成における新しい知見を得たので報告する。

### 【対象および方法】

MDCK細胞をglass bottom dishに培養したのち実験に供した。細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の測定に関しては、Oregon Green BAPTA-1 AM ( $10\ \mu\text{M}$ )にて処理後、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度測定装置 (ARGUS-50) を装備した倒立型顕微鏡上にて観察した。また、0.5-2.0 mM硫酸を添加し細胞内の変化を調べた。また、あらかじめheparinもしくはheparan sulfate (HS) にて前処置した場合の細胞と、*in vitro*でHSPGの機能を調べるため樹立したKIC-synd-1細胞についても、同様の実験を行なった。形態学的変化を、透過型電子顕微鏡にて観察した。

### 【結果および考察】

細胞外硫酸濃度が高いほど ( $>1\ \text{mM}$ )、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ は有意 ( $p<0.05$ ) に低下する傾向であった。また、細胞外液のpHが7.0以下で細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は、一過性の上昇を認めた。アシドーシスによる細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の上昇は、明らかに細胞内カルシウムストアからの放出に起因するもので、結石形成において重要な反応と考えられた。硫酸添加時に細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ が低下する原因として、細胞内に流入した硫酸が、細胞内のfreeの $\text{Ca}^{2+}$ と結合することにより低下するのではないかと考えられた。透過型電子顕微鏡所見では、硫酸添加群において、細胞室内にvacuolizationとその内部にcell debrisと塩類を含んだコロイド状の変化をきたしていた。この変化は、結石形成の初期段階として重要な反応と考えられた。以上の結果より、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ は、硫酸添加やpHの変化にて短時間内に変化し、硫酸添加群においてはfreeの硫酸が細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ と結合し、さらに細胞質内で結晶形成を起こしうる可能性が示唆された。一方HSは、細胞表面をcharge barrierにて覆うことにより、硫酸イオンの細胞内流入を阻止することにより細胞傷害を防ぐ働きがあり、 $\text{CaOx}$ 結石形成抑制のために重要な役割を演じている事が示唆された。

## ヒト近位尿細管細胞における結石関連蛋白の発現について

金沢医科大学 医学部 泌尿器科

森山 学、鈴木孝治

### 【研究目的】

多数の尿路結石症関連物質より最近特に研究が進みかつ、分子生物学的に検討されている3つの物質つまりrenal prothrombin fragment-1 (RPTF-1)、osteopontin (OPN) そしてbikunin に注目し培養細胞を用いてそれらの発現とその局在、またそれらが尿酸の尿細管細胞に対する影響に関連しているかを確認するのを目的に本実験を遂行した。

### 【実験方法】

ヒト尿細管上皮細胞を用い継代培養を行った。尿酸による細胞障害の確認には尿酸を添加した培養細胞にnitroblue tetrazolium (NBT) をもちいて活性酸素の局在を求めた。またそれら尿酸添加による刺激後の細胞からTotal RNAを抽出しreal time PCR法でmRNAの発現率を同時に比較検討した。蛍光免疫染色はそれぞれの蛋白質のpolyclonal抗体を用いメッセージの発現に伴う蛋白の存在をさらに検討した。

### 【実験結果】

control群と比較して尿酸添加群では活性酸素の発現が確認された。結石関連蛋白質であるRPTF-1、OPNおよびbikuninの発現がRT-PCRで確認され、real time PCR法を用いたmRNAの発現率の検討でhouse keeping geneに対する発現率はいずれの蛋白でもコントロール群に比べ尿酸負荷後60分経過した時点で上昇傾向にあった。なかでもRPTF-1およびOPNで有意差を持って上昇していることが確認された。蛍光抗体を用いた免疫染色ではmRNAの発現に裏付けられるように細胞質におおのこの抗原が蛍光物質で標識されているのが確認された。

### 【まとめ】

ヒト培養細胞でもこれまで検討されていた結石関連蛋白質の発現から蛋白の存在を確認しまた同時に尿酸により発生している活性酸素の局在も提示することができた。尿酸刺激による細胞膜での活性酸素の発生とこれら蛋白の発現は強い関係があるように示唆された。

## 蔞酸カルシウム結石形成モデルにおける腎集合管細胞での phosphatidylserine 発現とその定量的評価

旭川医科大学 医学部 泌尿器科<sup>1)</sup>

遠軽厚生病院 泌尿器科<sup>2)</sup>

山口 聡<sup>1)</sup>、加藤祐司<sup>1)</sup>、高下紀子<sup>1)</sup>、

和田直樹<sup>1)</sup>、八竹 直<sup>1)</sup>、奥山光彦<sup>2)</sup>

### 【目的】

尿路結石形成の初期過程において結晶細胞間相互作用は重要である。尿路上皮細胞傷害時にシュウ酸カルシウムなどの結晶の接着が増加することが知られ、その要因の一つに細胞膜表面へのphosphatidylserine (PS) の露出がある。細胞培養による*in vitro*実験では、高濃度のシュウ酸が細胞傷害を惹起し、細胞膜外方でのPS発現が増加することによって、細胞にcalcium oxalate monohydrate (COM) 結晶が接着しやすくなることが明らかとなっている。しかしこのような状態でのPSの発現については、*in vivo*実験では検討されておらず、加えてその定量的評価も行われていない。われわれはシュウ酸カルシウム結石形成モデルを用いて、高シュウ酸尿下における腎集合管細胞でのPSの発現をflowcytometry (FCM) により検討した。

### 【方法】

腎実質障害を最小限に抑制し、かつ確実に高シュウ酸尿を誘発するように調整した実験群を5グループ設定した。G1：0.1% Ethylene glycol (EG) + 1%塩化アンモニウム (AC)、G2：0.2% EG + 1% AC、G3：0.4% EG + 1% AC、G4：0.4% EG単独、G5：0.8% EG単独。以上のspecial waterを6週齢、雄性SDラットに対し、9-14日間、自由摂水させた。代謝ケージにて24時間尿を収集後、sacrificeし、採血後に速やかに右腎を摘出した。腎乳頭部を切除、PBSで洗浄、細切した後、dispaseおよびcollagenase処理にて腎集合管細胞を単離した。これらの細胞に、PSを特異的に認識するAnnexin V (FITC標識) を反応させ、propidium iododeと二重標識の後、FCM (EPICS Elite、Beckman-Coulter Inc.) による解析をおこなった。左腎は、HE、von Kossa、Pizzolato染色などの組織学的検討に供した。

### 【結果と結論】

コントロール群 (tap water) と比較して、Annexin V-FITC陽性細胞 (PS発現細胞) は、EG投与量に伴って徐々に増加していた。FCMにより、PS発現細胞の定量的評価は可能であり、細胞傷害による結晶細胞間相互作用への影響がより明確に分析されるものと期待される。

【平成14年度（第3回研究成果発表会）】

平成14年11月30日、旭川医科大学機器センター会議室

1. ヒトOPN-DNA polymorphismについての検討  
(近畿大学) 辻 秀憲
2. 抗酸化物質による結石形成抑制  
～尿路結石症における抗酸化作用および酸化ストレスによるアポトーシスの検討～  
(名古屋市立大学) 戸澤啓一
3. 腎尿細管上皮細胞に存在するheparan sulfate (HS)/heparan sulfate proteoglycan  
(HSPG、syndecan-1) の蔭酸およびCOM結晶に対する役割について  
(久留米大学) 近間秀明
4. 蔭酸カルシウム結晶の腎・尿細管細胞への刺激とrenal prothrombin  
(RPTF-1) およびその他の関連遺伝子のマクロアレイを利用した検討  
(金沢医科大学) 森山 学
5. 衝撃波による尿路上皮細胞傷害と衝撃波がcrystal-cell interactionにおよぼす  
影響の検討  
(旭川医科大学) 山口 聡

## ヒトOPN-DNA polymorphism についての検討

近畿大学 医学部 泌尿器科

辻 秀憲、紺屋英児、栗田 孝

### 【背景と目的】

オステオポンチン (OPN) はカルシウム含有結石のマトリックス成分の1つであり、結石形成時に腎尿細管細胞で発現が増強していることや尿酸カルシウム結晶と尿細管培養細胞との接着作用など、結石形成過程において重要な役割を担っていることが知られている。OPNは正常腎にも存在するが、結石形成時に強い影響がある場合、OPN-DNAにpolymorphismが生じることも推察される。そこで、尿路結石患者と健常者のOPN-DNAについて比較検討した。

### 【方法と結果】

ヒト末梢血の白血球よりOPN-DNAを抽出した。制限酵素Ava・を用いてOPN-DNAを3つのfragments (OPN-1~3) に分け、各々SSCP (strand conformation polymorphism) 解析を行った。尿路結石患者の場合、OPN-3では高頻度に移動度の差を認めた為、その部位のdirect sequenceを行った。尿路結石患者では、codon250で高頻度にGCC→GCT (Cytosine→Thymine) へのpolymorphismを認めた。さらにこのpolymorphismの頻度、タイピングをRFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism) 法を用いて行った。制限酵素Alu・を加えると、GCC homoでは認識部位が1カ所で、GCC/GCTでは、3カ所、GCC homoでは認識部位が2カ所となり、タイピングが可能となる。健常者は45名のうちGCC homo 16名、GCC/GCT 18名、GCT homo 11名であった。結石患者は93名のうちGCC homoが3名、GCC/GCT 57名、GCT homo 33名であった。次に、両親のどちらかが尿路結石で、子供も結石を有する5家系で同様の検討を行うと、結石患者の子供は親のOPN-DNAのmutationが受け継がれていると考えられた。両親が結石患者でなく、子供が結石患者である4家系では、2家系で子供は片親と同じ多型表現型で、2家系で両親がホモ型で、子供がヘテロであった (親子で違う表現型であった)。

### 【結論】

今回指摘したOPN-DNAにpolymorphismは同義置換で蛋白構造に差はなかった。しかし、尿路結石症患者で今回のpolymorphismのgene frequencyは高く、coding levelでありながら、これが上流のenhancer 領域など蛋白合成に関わる部位の変異にリンクしている可能性はある。exon全域の多型検索した文献も見られるが、50例前後のタイピングではアレル頻度の決定は非常に難しいのが現状である。今後まず多くのコントロールの多型解析が必要と考えられる。

## 抗酸化物質による結石形成抑制

～尿路結石症における抗酸化作用および酸化ストレスによるアポトーシスの検討～

名古屋市立大学 大学院医学研究科 病態外科学講座

腎・泌尿器科学

戸澤啓一, 郡 健二郎

### 【目的】

われわれはこれまで、緑茶が腎尿細管内の尿酸カルシウム結晶形成を抑制することを報告してきた。そこで今回は以下の点について検討した。①緑茶のどの成分が作用しているのか。②その作用機序はいかなるものか。緑茶の主効能から抗酸化作用が主であると考えられ、腎組織中SOD (superoxide dismutase) 活性、酸化ストレスによるアポトーシスを検討した。③*in vitro*においても同様な検討をするため、MDCKを低酸素状態におくことにより酸化ストレスをかけ、抗酸化物質であるcatechinおよびprobucolを添加し検討した。

### 【方法】

- I. 緑茶を投与した結石モデルラットの腎total RNAを抽出しOPN (osteopontin)、SODについてRT-PCRを行った。腎組織中SOD活性は亜硝酸法で測定した。酸化ストレスによるアポトーシスはTUNEL法、p53、bcl-2免疫染色で検討した。
- II. MDCKをLab-Tekに培養しBBL gas packを用いhypoxia-induced oxidative stressをかける。ここへEGCG (epigallo-catechin gallate) を添加 (0、0.1、0.5、5mg/ml) し16時間後に固定、SOD、アポトーシスについて検討した。

### 【結果】

- I. 腎組織中SOD活性は緑茶投与群は結石形成群に比較し有意に増加が認められた。結石形成群ではTUNEL陽性細胞、p53発現が増加し、bcl-2発現が減少していた。
- II. 酸化ストレスによりアポトーシス認められ、EGCG濃度依存的にSODタンパクの発現が増加した。培養液中のSOD活性もEGCG濃度依存的に増加した。

### 【考察】

尿酸カルシウム結晶形成抑制には緑茶成分の中でcatechinが作用している。作用機序は*in vivo*、*in vitro*の結果から酸化ストレスによるアポトーシス抑制を介した抗酸化作用が主であると考えられた。抗酸化作用は血管内皮細胞でもみられ現在では抗酸化物質が動脈硬化症の予防に投与されている。結石治療においても将来、抗酸化物質投与が有効であるのか検討する必要があると考えられた。



## 腎尿管上皮細胞に存在する heparan sulfate (HS)/heparan sulfate proteoglycan (HSPG、syndecan-1) の蔞酸および COM 結晶に対する役割について

久留米大学 医学部 泌尿器科学教室<sup>1)</sup>

同 第2生理学教室<sup>2)</sup> 同 化学教室<sup>3)</sup>

飯田 如<sup>1)</sup>、近間秀明<sup>1)</sup>、川越伸俊<sup>1)</sup>、井上通朗<sup>1)</sup>、  
野田進士<sup>1)</sup>、石松 秀<sup>2)</sup>、高園磯子<sup>3)</sup>

**【背景および目的】** これまでに我々は、蔞酸カルシウム結石形成ラット腎における heparan sulfate (HS)、および heparan sulfate proteoglycan (HSPG、syndecan) の発現が亢進していることを報告してきた。近年結石形成過程で、crystal-cell interactionの重要性が指摘され、この現象は蔞酸による細胞傷害が関与しているとの報告がなされている。一般的に、細胞傷害により細胞内カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) が変化することが知られている。昨年度までに我々は、1) 高濃度の蔞酸暴露によりMDCK細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ が変化すること、2) HSにて前処理されたMDCK細胞に蔞酸暴露しても細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ は変化せず、細胞傷害も抑制されていたこと、3) syndecan-1導入MDCK細胞 (KIC-synd-1) においても、HS処理されたMDCK細胞と同様、蔞酸暴露に対して細胞保護効果があることを報告してきた。今回我々は、HSおよびsyndecan-1の蔞酸暴露およびcrystal-cell interactionに対する役割について検討したので報告する。

**【対象および方法】** MDCK細胞とKIC-synd-1細胞を培養したのち実験に供した。細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の測定に関しては、Oregon Green BAPTA-1 AMにて処理後、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度測定装置 (ARGUS-50) を装備した倒立型顕微鏡上にて観察した。また、蔞酸 (1.0 mM) を添加し細胞内の変化を調べた。また、あらかじめHSにて前処置した場合の細胞と、KIC-synd-1細胞についても、同様の実験を行なった。また、Crystal-cell interactionについては、SEMによるCOM crystalの細胞表面への付着状態を観察した。蔞酸によるcell viabilityの変化は、MTT assayにて行なった。

**【結果】** 蔞酸暴露による細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ は有意 ( $p<0.01$ ) に低下する傾向であった。一方、HS処理後MDCK細胞およびKIC-synd-1細胞では、蔞酸暴露による細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の変化は認めなかった。KIC-synd-1細胞における、syndecan-1の遺伝子および蛋白レベルでの発現は、蔞酸添加により有意に亢進していた ( $p<0.01$ )。また、蔞酸暴露時のcell viability低下は、HS処理群およびKIC-synd-1細胞では認められなかった。COM crystal添加時の細胞表面への吸着は、MDCK細胞に比較してKIC-synd-1細胞で少ない傾向にあった。一方、KIC-synd-1細胞をheparitinase処理し、細胞表面のHSを除去すると、COM crystalの付着は著明に増加した。

**【結論】** 尿管上皮細胞表面に存在するHSおよびsyndecan-1は、蔞酸暴露に対する細胞傷害をとCOM crystalの細胞表面への付着を抑制する結果、蔞酸カルシウム結石形成を阻止する役割を果たすことが示唆された。

## 尿酸カルシウム結晶の腎・尿細管細胞への刺激とrenal prothrombin (RPTF-1) およびその他の関連遺伝子のマクロアレイを利用した検討

金沢医科大学 医学部 泌尿器科

森山 学、宮澤克人、鈴木孝治

### 【背景・目的】

尿路結石症の発生機序を考えるにおいて結石構成成分の一つである尿酸による細胞刺激が及ぼす尿細管細胞の変化はさまざまな意味での関与が示唆されていた。われわれは尿路結石症における結石関連蛋白としてのRPTF-1という物質を検討している中でその本体であるプロトロンビンの働きのひとつとして急性期の炎症反応に介在する炎症関連物質であることに注目した。実際に細胞刺激に起因する細胞障害も一種の炎症反応として伝播するはずであり、以前より我々が報告したように過尿酸尿症の状態で発現率が増加するRPTF-1においては前述のpathwayとして非常に有力視される。今回我々はその経路の確認と解明のために実際のところ尿細管上皮細胞に対する尿酸刺激が実際にRPTF-1 mRNAをプロモートし蛋白を発現しているのかを確認し検討することにした。また基礎医学研究においても遺伝子工学技術の進歩に伴い、機能ゲノム科学の観点から検討が展開されこのような背景のもと、結石形成が複数のステップからなる複雑な現象であり、各々の過程で多くの遺伝子群の関与が推定されることより、その分子機構の解明には多数の遺伝子群の発現パターンの同時解析が必要と考えられる。そのためDNAマクロアレイ法を使用して尿酸カルシウム (CaOx) 結晶暴露前後の腎尿細管培養細胞の遺伝子群の発現プロファイル解析を試みた。

### 【方法】

尿細管細胞はイヌ遠位尿細管由来のMadin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞を用いRPMI 1640に終濃度5%となるようにfetal bovine serumを添加し5%CO<sub>2</sub>下に37℃で培養を行った。培養液には尿酸を(終濃度1mM)添加し、RT-PCRによるmRNAの発現の確認を行ないそのプロモーター領域の遺伝子配列をligationして下流にluciferaseの配列をつけてMDCK細胞にtransfectionし尿酸とprothrombinのプロモーターとの関連を見た。さらにprothrombin Abを用いた培養細胞におけるRPTF-1蛋白質の局在の検討をおこなった。マクロアレイに関しては現存するアニマルモデルであるラットの尿細管培養細胞NRK-52Eを用いCaOx結晶およびを添加し暴露前後のmRNAを抽出した。Atlas Expression Array Kitを用いて<sup>32</sup>P標識cDNAプローブを作製し、プレハイブリダイゼーションしたRat Array (Toxicology 1.2 Array) ナイロン膜とハイブリダイズさせglobal sum normalization法で遺伝子発現の変化を評価した。

## 【結果】

RT-PCRによりイヌ遠位尿細管培養細胞でのRPTF-1 mRNAの発現が確認されイヌにおけるprothrombinの遺伝子配列の一部を確認した。luciferase遺伝子を導入したMDCK細胞に尿酸を負荷することで発色が確認され確実に尿酸刺激でprothrombinのプロモーターが働いていることが確認され同時に行った免疫染色ではRPTF-1の局在は同様に細胞質に確認された。NRK-52Eにおけるアレイの結果はCaOx結晶暴露前後での多数遺伝子の同時解析とプロファイリングが可能であり30遺伝子に発現量の変化を認めた。このうち2倍以上増加した遺伝子は9遺伝子で従来から報告されているosteopontinが含まれていた。

## 【考察】

現在まで報告されている腎組織でのprothrombinの発現は過尿酸尿状態や培養細胞への尿酸負荷により増加することが確認されているが、今回の検討で確実に尿酸刺激でRPTF-1蛋白のmRNAがプロモートされていることが確認された。またこのことより尿中尿酸刺激が尿細管細胞からのRPTF-1の発現を促し、尿酸結石とRPTF-1蛋白との関係がより近いものであることが確認できた。すなわち細胞膜を介して開始された科学的刺激のシグナルがある一定の経路を持って伝達されて結石関連蛋白をプロモーションしている可能性が示唆され、一方マクロアレイによりRPTF-1蛋白質以外に複数の炎症系の遺伝子の関連が認められ、結石の形成や生体での抑制機構を解明する上で今後はそれらの相互作用のさらなる検討が必要であると考えられた。

## 衝撃波による尿路上皮細胞傷害と衝撃波が crystal-cell interaction におよぼす影響の検討

旭川医科大学 医学部 泌尿器科

山口 聡、加藤祐司、中園周作、高下紀子、八竹 直

【背景と目的】体外衝撃波碎石術（以下SWL）後の尿路結石の再発率が高いことが知られており、SWL後の微小碎石片の存在が主な原因として考えられてきた。尿路結石形成の初期過程においてcrystal-cell interactionは重要な因子であり、尿路上皮細胞の傷害時、細胞膜外方にphosphatidylserine (PS) が露出し、シュウ酸カルシウム結晶の接着が増加することがいろいろな実験で確認されている。SWLにおいても腎上皮細胞への細胞傷害は必発と思われる、われわれはこれが結石再発に関与するのではないかと推察した。そこで、細胞膜のPSの露出とそれに密接に関係するapoptosisの細胞内情報伝達系に注目して、衝撃波が腎集合管細胞に与える影響を動物実験で検討した。

### 【方法】

実験には、Pig (SPF、体重25kg、オス) 7頭を用いた。各pigを気管内挿管により全身麻酔後、排泄性尿路造影で腎杯の位置を確認し、右腎の中～下腎杯方向から、治療レベルの衝撃波を曝露した (Domier MFL 5000、14 kV、2000 shots)。採血と採尿後に両側腎を摘出、速やかに腎乳頭部を切離し、腎集合管細胞を分離した。サンプル部位は、Direct damage部位として右中～下腎杯、Indirect damage部位として右上腎杯、Intact部位として左上腎杯～下腎杯であった。分散細胞に、PSを特異的に認識するFITC標識Annexin Vを反応させ、propidium iododeと二重染色の後、flowcytometry (Beckman-Coulter Inc.、EPICS Elite) による解析を行った。一方、各部位から得られた細胞のcaspase 3、8、9活性についても分析した。

### 【結果】

衝撃波の曝露後、血清CPKと尿NAGの有意な上昇を認めた。PS陽性細胞は、衝撃波のDirect damage部位である右中～下腎杯で有意に増加していた。PS露出に至るapoptosis pathwayを更に上流で制御しているcaspase 3、8、9活性も、右中～下腎杯で有意に増加していた。これらの変化は、衝撃波が直接関与した中～下腎杯のみならず、衝撃波が間接的に作用したと思われる右上腎杯においても観察された。

### 【結論】

SWL後には、従来から指摘されていた腎実質障害に加えて、腎盂側の細胞群にも何らかのdamageが発生していると考えられる。そのうち細胞膜でのPSの露出は、尿路結石形成の初期段階に関与すると考えられており、新たな結石発生の場合となる危険性がある。これに患者が本来有している高尿酸尿などの因子が加わると、更に結石形成が促進されることが予想される。これらの変化が、従来考えられていた因子の他に、SWL後の尿路結石再発の増加に関与している可能性がある。

## 各年度における研究実績の概要

### (平成12年度)

1. 細胞・結晶の相互作用の検討では、尿酸カルシウム結石形成モデルにおけるcrystal-cell interactionの検討に適した*in vivo*実験系の確立がおこなわれた。その結果、従来の実験系であるethylene glycol、塩化アンモニウム の投与濃度や期間をmodifyすることにより、腎障害を最小限に抑制し、かつ尿酸カルシウムの結晶尿のみが惹起される条件の設定が可能となった。従って、*in vitro*でのcrystal-cell interactionに関する実験結果は、*in vivo*実験においても応用できることが確かめられた。
2. 結石関連蛋白の分離精製及び分子生物学的分析については、オステオポンチン(OPN)、カルプロテクチンの精製がおこなわれ、これらにコラーゲンやフィブロネクチン等の基質を付着させ、尿酸カルシウム結晶の凝集・成長に与える影響が検討された。その結果、コラーゲン顆粒をcoatingしたOPNは、シードクリスタル法において尿酸カルシウム結晶の凝集・成長を促進する作用が認められた。
3. OPNのantisense遺伝子導入については、遺伝子導入による結石形成抑制の試みと尿細管細胞における発現機構の検討がおこなわれた。その結果、コントロールベクターを導入した腎では尿酸カルシウムのプラークが形成されたが、OPN antisenseの遺伝子導入によりOPN発現と尿酸カルシウムのプラーク形成が抑制された。OPNは結石形成に重要な物質であり、将来、遺伝子治療の標的遺伝子となりうる可能性が示唆された。
4. Antisenseを用いた尿路結石抑制物質の検討では、ヒトsyndecan-1発現腎尿細管上皮細胞株の樹立がおこなわれた。その結果、ヒトsyndecan-1を発現するMDCK細胞が樹立され、これらの細胞の陰性荷電が強いこと、syndecan-1、antisenseの導入により、syndecan-1は細胞質内と核内に存在することが確認された。これらは、ヘパラン硫酸が尿酸カルシウム結石形成過程におけるcrystal-cell interactionに関して、どのような役割を担うのかを検討する指標となることが示唆された。
5. 結石関連蛋白質のmRNA発現コントロールによる結石形成、結石抑制への影響については、ラット腎におけるプロトロンビンmRNAの発現の確認と発現制御についての検討がおこなわれた。その結果、ラット腎より抽出されたRNAから腎由来プロトロンビンF-1のmRNAの発現が確認され、結石形成ラットにおいてその発現強度に変化が見られることが確認された。

(平成13年度)

1. 実験的尿路結石モデルでのcrystal-cell interactionは、蓚酸カルシウム (CaOx) 結石形成モデルにおける腎集合管細胞でのphosphatidylserine (PS) 発現とその定量的評価が検討された。細胞膜表面へのPSの露出は、尿路結石形成の初期過程におけるCaOx結晶の接着を規定する要因の一つであり、PSを特異的に認識するAnnexin Vを用いたflowcytometryにより検討した結果、CaOx結石形成ラット群において、腎集合管細胞において有意にPS発現細胞が増加していることが明らかとなった。
2. 結石関連蛋白の培養細胞での発現とその機能的検討は、CaOx結晶のMDCK細胞への付着およびthrombin、osteopontin (OPN) antisense処理後の細胞への付着が、<sup>45</sup>Ca測定および走査型電子顕微鏡により検討された。その結果、MDCK細胞へのCaOx結晶の付着はOPN蛋白によって促進されること、またそれはthrombinやantisense oligonucleotideにより阻害されることが明らかとなった。
3. 実験的CaOx結石モデルへのOPNのantisense遺伝子導入と各種サイトカイン、接着分子については、細胞内情報伝達系におけるOPNの発現機構と結石形成との関係が検討された。尿細管培養細胞 (MDCK、NRK細胞) にOPNとvitronectinを添加すると、細胞内のOPN発現の増加とFocal adhesion kinase (FAK) のリン酸化促進が観察され、OPNによるFAKを介したOPNの自己分泌機構の関与が推定された。一方、OPNの発現を制御する転写因子RUNX2の検討では、RUNX2はOPNの上流部位に結合し転写を促進していることが示唆された。
4. 培養細胞系における蓚酸やCaOx結晶による細胞障害は、CaOx結石形成過程における高分子抑制物質heparan sulfate (HS) の機能解析として、腎尿管上皮細胞での細胞内Ca<sup>2+</sup>の変化が検討された。その結果、細胞内Ca<sup>2+</sup>は、蓚酸添加やpHの変化にて短時間内に変化し、蓚酸添加群において細胞質内でCaOx結晶形成を起こしうることが明らかとなった。一方、HSは細胞表面のcharge barrierとして、蓚酸イオンの細胞内流入を阻止することで細胞傷害を防ぎ、CaOx結石形成抑制に関与している事が示唆された。
5. 結石関連蛋白質のmRNA発現コントロールによる結石形成、結石抑制への影響については、ヒト近位尿管細胞に対する結石関連蛋白の発現および蓚酸による細胞傷害が検討された。ヒト培養細胞においても結石関連蛋白質の発現から蛋白の存在が確認され、蓚酸による細胞障害の結果、細胞膜での活性酸素の局在が明らかとなった。蓚酸刺激による活性酸素の発生とこれら蛋白の発現は強い関係があると考えられた。

(平成14年度)

1. 細胞結晶間相互作用については、実験的尿酸カルシウム結石形成モデルにおける腎上皮細胞と尿酸カルシウム結晶の接着の検討が行われた。その結果、尿中尿酸排泄量や尿酸カルシウム結晶の増加に伴い、細胞表面にphosphatidylserineが露出する細胞が徐々に増加し、apoptosis pathwayも活性化されていることが確認された。
2. 結石関連蛋白の分離・精製と分子生物学的分析については、osteopontin (OPN) -DNA polymorphismが検討された。SSCPとRFLP解析の結果、尿路結石症患者のpolymorphismは同義置換で蛋白構造に差はなかったが、そのgene frequencyは高く、これが上流のenhancer領域など蛋白合成に関わる部位の変異にlinkしている可能性が示唆された。
3. OPN antisense遺伝子導入と各種サイトカインと接着分子との関連の検討については、抗酸化物質による結石形成抑制～尿路結石症における抗酸化作用および酸化ストレスによるapoptosisの検討～が行われた。その結果、抗酸化物質であるcatechinが、酸化ストレスによるapoptosis抑制を介し、尿酸カルシウム結晶形成に対し、抑制的に作用することが示唆された。
4. 腎尿細管細胞へのヘパラン硫酸 (HS) 遺伝子導入と細胞傷害については、腎尿細管上皮細胞に存在するHS/HS proteoglycan (PG) の尿酸および尿酸カルシウム1水和物 (COM) 結晶に対する役割が検討された。その結果、HSおよびHSPGは、尿酸曝露に対する細胞傷害とCOM結晶の細胞表面への付着を抑制する結果、尿酸カルシウム結石形成を阻止することが示唆された。
5. 動物実験系と培養細胞におけるprothrombin遺伝子を中心とする結石関連蛋白の分子生物学的分析については、尿酸カルシウム結晶の腎・尿細管細胞への刺激とrenal prothrombin (RPTF-1) およびその他の関連遺伝子のマクロアレイを利用した検討が行われた。その結果、尿酸刺激でRPTF-1蛋白のmRNAがpromoteされることが確認された。またマクロアレイにより、RPTF-1蛋白質以外に複数の炎症系の遺伝子の関連が認められ、その中にOPNが含まれることが明らかとなった。



## Summary

### 1. Study of crystal-cell interactions :

An experimental model of calcium oxalate (CaOx) stones, suitable for investigation of crystal-cell interactions, has been established. It was confirmed that the phosphatidylserine exposure on the outer leaflet of the cell membrane of renal collecting duct cells could be evaluated quantitatively by using this model. Increased phosphatidylserine expressing cells and activation of the caspase family (intracellular signal transduction systems for apoptosis) were noted with increasing urinary oxalate excretion and calcium oxalate crystals.

### 2. Purification of stone-related proteins and their molecular biological analysis :

Osteopontin (OPN) and calprotectin were purified. The adhesion of CaOx crystals to MDCK cells was promoted by OPN, while it was suppressed by thrombin and antisense oligonucleotide. It seems likely that OPN-DNA polymorphism in patients with urinary tract stones is involved in mutation of the enhancer regions that are related to synthesis of OPN protein.

### 3. OPN antisense gene transfer :

The introduction of OPN antisense gene to renal tubular cells suppressed OPN expression and CaOx stone formation in the kidneys. The addition of OPN and vitronectin to renal tubular cells in culture elevated the intracellular expression of OPN and promoted the phosphorylation of focal adhesion kinase. Catechin suppressed the formation of CaOx crystals through inhibiting apoptosis induced by oxidative stress.

### 4. Study of urinary tract stone inhibitors using antisense gene :

Human syndecan-1-expressing renal tubular cells were established. Heparan sulfate (HS) and HS proteoglycan were found to suppress the cellular injury by oxalate exposure and the adhesion of CaOx crystals to the cell surface. It was suggested that HS prevented the cell injury by serving as a charge barrier that inhibited the influx of oxalate ions into the cells.

### 5. Effects to stone formation by controlling the expression of stone-related protein mRNA :

Increased expression of renal prothrombin F-1 (RPTF-1) mRNA in rat kidneys with CaOx was confirmed. In the macro-array analysis, it was noted that RPTF-1 protein, OPN gene, and the multiple genes encoding inflammatory systems were increased after CaOx crystal exposure to the renal tubular cells.