

オステオポンチンの遺伝子組換えによる尿路結石形成機序の 解明と分子標的治療への応用

濱本 周造, 安井 孝周, 岡田 淳志, 広瀬 真仁
小林 隆宏, 新美 和寛, 藤井 泰普, 伊藤 恭典
戸澤 啓一, 郡 健二郎

名古屋市立大学大学院医学研究科腎・泌尿器科学分野

FUNCTIONAL DOMAINS OF OSTEOPONTIN STIMULATE RENAL CRYSTAL FORMATION: ANALYSIS OF OPN-TRANSGENIC MICE

Shuzo HAMAMOTO, Takahiro YASUI, Atushi OKADA, Masahito HIROSE,
Takahiro KOBAYASHI, Kazuhiro NIIMI, Yasuhiro FUJII, Yasunori ITOH,
Keiichi TOZAWA and Kenjiro KOHRI

The Department of Nephro-Urology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

Osteopontin (OPN) has been described to play a nonredundant role in the formation of renal crystals. This biological activity of OPN may be attributed to its characteristic structure, which includes 2 calcium-binding sites, Arg-Gly-Asp (RGD) sequences. To test this hypothesis, we evaluated wild-type mice (WT group), OPN-knockout mice (KO group), and two types of transgenic mice : (1) one type carrying a transgene in which the sequences coding for the 2 calcium-binding sites of the OPN were deleted (CaX group) and (2) the other type carrying a transgene in which the sequence that codes for the RGD sequence of the OPN was modified to one that codes for Arg-Gly-Glu (RGE ; RGE group). Changes occurring after intraperitoneal injection of glyoxylate for 9 d were analyzed. The amount of crystals deposited was the greatest in mice of the WT group and the least in those of the KO group. The number of crystal deposits in mice of the RGE and KO groups was approximately the same. Microscopic observations revealed that the crystal nuclei in mice in the CaX group were stratified and exhibited a disordered pattern ; this pattern was dissimilar to that observed in the mice in the WT and RGE groups, wherein the crystal nuclei exhibited a rosette petal-like radial pattern. The results indicate the possibility that each domain contributes to the mechanism by which OPN stimulates crystal formation.

(Hinyokika Kiyo 57 : 55-58, 2011)

Key words : Renal crystal formation, Osteopontin, Transgenic mice, RGD sequence, Calcium-binding domains

緒 言

本邦における尿路結石の発症頻度は、急激に増加し、生涯罹患率は男性では7人に1人、女性では15人に1人となっている¹⁾。さらに、5年再発率は約50%と報告されている。尿路結石は、食生活や生活様式の欧米化とも関係しており、今後も増加すると考えられている。これまでの尿路結石の治療は、尿中カルシウム (Ca) やシュウ酸など無機物質からのアプローチが中心であったが、この増加傾向を考えると、新たな治療法・予防法の開発が望まれる。

尿路結石は、シュウ酸と Ca が尿中に析出し結晶核を形成したのち、結晶の成長、凝集、固化という多段階の過程を経て形成される。結晶核が形成されてから凝集するまでは、主に無機物質が関係しているが、体内で結石となるには、有機物質 (マトリックス) が必

要である。私たちは尿路結石内に数%含まれるマトリックスが結石形成に重要であると考え、その成分を世界に先駆けてクローニングし、塩基配列を決定し、オステオポンチン (OPN) を同定した²⁾。OPN は約300のアミノ酸からなり、分子量 41 kDa の分泌型酸性リン酸化蛋白質である。構造上に多数の機能的アミノ酸配列を有しており (Fig. 1)、多くの臓器における石灰化作用、炎症反応、細胞死などの生理的・病理学的

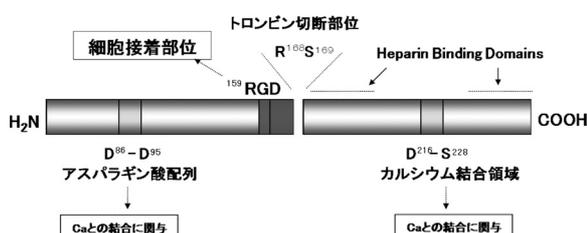


Fig. 1. Putative motifs in osteopontin (OPN).

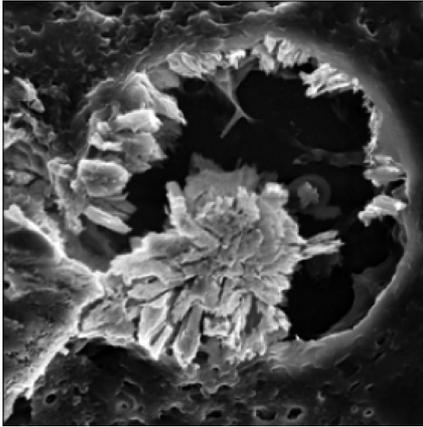


Fig. 2. The adhesion of calcium crystals to the renal distal tubule cell observed by SEM.(original magnification, $\times 2,000$).

反応などに関わっている³⁻⁵⁾。

Ca 結晶が成長する際、結晶核が瞬時に尿細管を閉塞するほどの塊にはならず、結石形成初期には結晶と尿細管細胞壁との接着が重要である^{6,7)}。実際、結石ができたマウスの腎尿細管細胞を観察すると、結晶が尿細管を閉塞しているのではなく、尿細管細胞壁に接着し、成長していることがわかる (Fig. 2)。これらの背景をもとに私たちは、OPN には結石形成に関わる 2つのアミノ酸配列 (①カルシウムと親和性の高い

2カ所の Ca 結合領域⁸⁾と、②インテグリンや CD44 と結合し細胞接着に関わる Arg-Gly-Asp (RGD) 配列⁹⁻¹¹⁾があることに着目した。そこで本研究では、これらの2つのアミノ酸配列 (① Ca 結合領域, ②細胞接着領域 (RGD 配列)) をそれぞれ変異し、機能欠失させた遺伝子組換えマウスを作成し、結晶形成を比

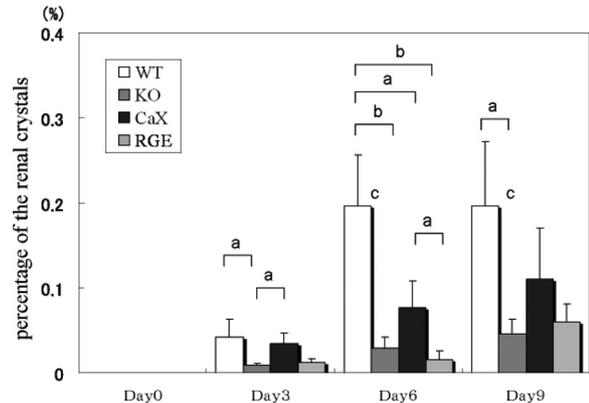


Fig. 3. The area of the regions that stained positively using the Pizzolato method was measured and expressed as a percentage of the total cross-sectional area of the kidney tissue using NIH image 1.61 software. Data are presented as the mean \pm SD. ^aP < 0.05, ^bP < 0.01, ^cP < 0.05 vs day 3 in the WT group.

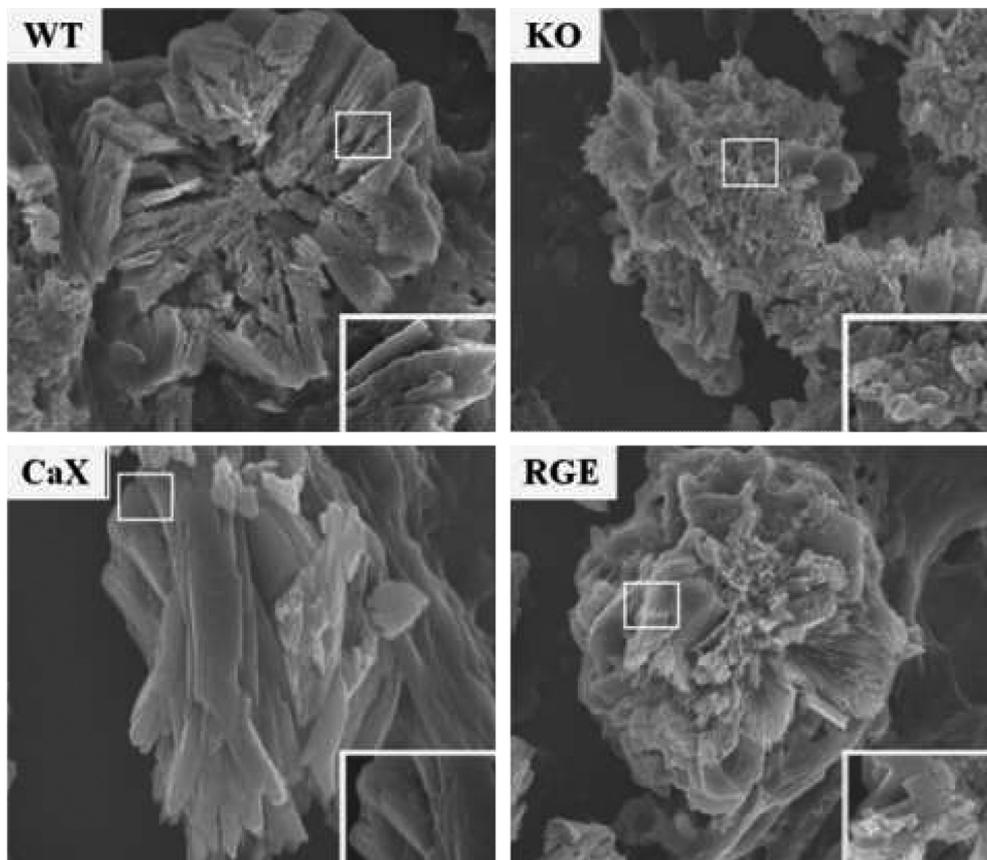


Fig. 4. Microstructural observation of the crystals of each group by SEM (original magnification $\times 8,000$, inset $\times 30,000$).

較することで, 機能部位の解析を行った.

対象と方法

①2箇所のCa結合領域を欠失させた変異OPN遺伝子, ②アミノ酸配列がRGDからRGEへ変化するよう塩基配列を組換えさせた変異OPN遺伝子をそれぞれマイクロインジェクションによる遺伝子導入を行い, 2種類の変異OPN発現マウス(以下, CaX群, RGE群)を作成した. 8週齢C57BL/6雄マウスのコントロールマウス(WT群), OPNノックアウトマウス(KO群), CaX群, RGE群の4群(各28匹)に, シュウ酸の前駆物質であるグリオキシル酸(100 mg/kg)を連日腹腔内投与し, 投与0, 3, 6, 9日目に, 腎組織を採取した. 結晶形成の評価を, 形成数・結晶形態の微細構造につき検討した. 結晶数はPizzolato染色にて, シュウ酸カルシウム結晶の形成部位を観察し, 腎組織切片に対する結晶形成部位の面積比率で結晶形成量を算出した. 微細構造は走査型電子顕微鏡(scanning electron microscopy; SEM)を用いて, 形成された結晶の形態を比較した.

結果

結晶形成は各群とも投与3日目より確認できた. 各群とも経日的に増加を認めたが, WT群のみで有意差が見られた. 結晶形成量はWT群で最も多く, 次いでCaX群で多く, RGE群とKO群では少量であった(Fig. 3: 文献12より引用). 結晶の形態構造は, WT群では, 放射状に成長する結晶核が整然と連なり, 花卉状構造を示していた. RGE群ではWT群に類似し, 同様の結晶核がやや乱れて花卉状構造を示していた. 一方, CaX群では, WT群とは異なり, 立方体の結晶が秩序なく層状に連なる形態を示し, KO群では, 結晶核が小さく, 砂状に集まる形態を示していた(Fig. 4: 文献12より引用).

考察

オステオポンチン(OPN)は, 尿路結石のマトリックス成分の1つとして同定され, カルシウム結晶形成に深く関わっていると考えられている. OPNノックアウトマウスでは, コントロールマウスと比較して, シュウ酸カルシウム結晶形成数が少なく, 大きく成長しない¹³⁾. 本研究では, OPNの機能的部位(①カルシウム結合領域, ②RGD配列)を特異的に欠失させた2種類の遺伝子組換えマウスを作成し, 腎における結晶形成を観察し, OPNがいかなる機序で結晶形成に関わっているかを解明した. 細胞接着部位を機能不全にしたマウスでは, コントロールマウスと同様の結晶形態となるが, 結晶形成量は減少した. Ca結合領域を機能不全にしたマウスでは, 結晶形成量は多いも

の, コントロールマウスとは異なる形態を示した. 尿路結石が形成される多段階過程の中で, OPNの細胞接着領域(RGD配列)は, その形成初期において結晶と腎尿細管細胞との接着に関わることで, またカルシウム結合領域は, 結晶の成長過程に機能するものと推察された.

結語

本研究からOPNは, 2つの機能的アミノ酸を有することにより, 腎結晶形成過程における促進的な役割を担うことと思われた. この結果を踏まえ, 現在これらの機能的アミノ酸配列を特異的に阻害する中和抗体を*in vitro*および結石モデル動物への投与する研究を行っている. これらの研究が, 将来の結石再発予防を目的とした分子標的治療薬の開発の足がかりになればと期待する.

文献

- 1) Yasui T, Iguchi M, Suzuki S, et al.: Prevalence and epidemiological characteristics of urolithiasis in Japan: national trends between 1965 and 2005. *Urology* **71**: 209-213, 2008
- 2) Kohri K, Suzuki Y, Yoshida K, et al.: Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding urinary stone protein, which is identical to osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* **184**: 859-864, 1992
- 3) Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, et al.: Osteopontin—a molecule for all seasons. *QJM* **95**: 3-13, 2002
- 4) Giachelli CM, Speer MY, Li X, et al.: Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res* **96**: 717-722, 2005
- 5) Jansson M, Panoutsakopoulou V, Baker J, et al.: Cutting edge: attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in eta-1/osteopontin-deficient mice. *J Immunol* **168**: 2096-2099, 2002
- 6) Konya E, Umekawa T, Iguchi M, et al.: The role of osteopontin on calcium oxalate crystal formation. *Eur Urol* **43**: 564-571, 2003
- 7) Yasui T, Fujita K, Asai K, et al.: Osteopontin regulates adhesion of calcium oxalate crystals to renal epithelial cells. *Int J Urol* **9**: 100-108, 2002
- 8) Denhardt DT and Guo X: Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* **7**: 1475-1482, 1993
- 9) Pepinsky RB, Mumford RA, Chen LL, et al.: Comparative assessment of the ligand and metal ion binding properties of integrins alpha9beta1 and alpha4beta1. *Biochemistry* **41**: 7125-7141, 2002
- 10) Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, et al.: Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* **287**: 860-864, 2000
- 11) Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, et al.: Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* **271**: 509-512, 1996

- 12) Hamamoto S, Nomura S, Yasui T, et al.: Effects of impaired functional domains of osteopontin on renal crystal formation: analyses of OPN-transgenic and OPN-knockout mice. *J Bone Miner Res* **25**: 2436-2447, 2010
- 13) Okada A, Nomura S, Saeki Y, et al.: Morphological conversion of calcium oxalate crystals into stones is regulated by osteopontin in mouse kidney. *J Bone Miner Res* **23**: 1629-1637, 2008
(Received on October 14, 2010)
(Accepted on October 18, 2010)