

## オステオポンチンの多機能性と臨床応用への戦略

辻 秀憲, 梅川 徹, 植村 天受

近畿大学医学部泌尿器科学教室

### MULTIFUNCTIONAL CHARACTER OF OSTEOPONTIN AND STRATEGY FOR CLINICAL APPLICATIONS

Hidenori TSUJI, Tohru UMEKAWA and Hirotsugu UEMURA

The Department of Urology, Kinki University School of Medicine

Osteopontin (OPN) is the major constituent of calcium-containing urinary stones and is involved in the inhibition of nucleation and aggregation of calcium oxalate (CaOx) crystals, promotion of the adherence of CaOx crystals to cultured renal epithelial cells, and regulation of inflammatory cells as chemokine. OPN has different effects (inhibitor and promoter) at each stage of stone formation *in vitro* and these multifunctional actions of OPN have not been fully elucidated. We developed a modified crystal method using collagen granules (CG) and immobilized OPN. OPN had strong inhibitory activity on the aggregation/growth of CaOx crystals, but the inhibitory activity decreased by use of OPN-immobilized CG. OPN is also a critical promoter of adherence for CaOx crystals to cultured renal epithelial cells in an *in vitro* experimental system. We examined the effect of OPN *in vivo*, by OPN siRNA transfection in rats. Hydrodynamic intravenous and renal subcapsular injections with lipofection were performed on days 1 and 8. The calcium concentration in the kidney was significantly lower and the frequency of CaOx crystal deposits in the tubules was lower in the OPN siRNA transfection group (drinking 1.5% ethylene glycol (EG)), than in the EG drinking group (sham operation) at day 15. We examined the effect of candesartan, an angiotensin II (Ang II) type 1 receptor blockers (ARB) in hyperoxaluric rats. ARB reduced crystal formation and calcium concentrations in the whole kidney. Hyperoxaluria leads to CaOx crystallization and the development of tubulointerstitial lesions in the kidney. Ang II mediates OPN synthesis, which is involved in both macrophage recruitment and CaOx crystallization. OPN synthesis and production increased with hyperoxaluria but to a lesser extent in ARB-treated hyperoxaluric rats. These results show that oxalate can activate the renal renin-angiotensin system and that oxalate-induced upregulation of OPN is in part mediated via the renal renin-angiotensin system.

(Hinyokika Kyo 57 : 49-54, 2011)

**Key words :** Osteopontin, Urolithiasis

## 緒 言

尿路結石の形成機序には様々な因子が関与しているが、尿中に排泄される高分子蛋白もその1つである。そのうちオステオポンチン (OPN) は尿路結石の形成に重要な役割を有していることが諸家の報告からも明らかにされている<sup>1-3)</sup>。OPN は尿路結石のマトリックスを構成する蛋白の1つでもあり、その機能は *in vitro* にて相反する作用も報告されており、尿路結石形成の全体、各段階にどのように関与するのか、その詳細は明らかとなっていない部分も多い。OPN の作用として、1) 結晶成長・凝集の抑制、2) 結晶の尿管上皮細胞への付着の促進、3) 炎症細胞の遊走などの chemical mediator としての作用、があげられる。第59回日本泌尿器科学会中部総会シンポジウムでは OPN の多機能性という視点でわれわれがこれまで集積してきたデータを示し、臨床に応用できる分野に

ついて考察した。1, 2) を *in vitro* の、3) は *in vivo* の OPN に関する実験系として分けて提示する。

## 方法・結果

### 1) *In vitro*

Fig. 1 に Isotopes 法に準じたシードクリスタル法の概略を示す<sup>4-6)</sup>。人工尿の metastable solution に 蓚酸カルシウムの seed crystal を添加し、蓚酸カルシウムの結晶凝集・成長阻止能 (inhibitory activity) を測定した。OPN を単独で添加した場合とコラーゲン顆粒を加えたもの、さらにこのコラーゲン顆粒の表面に OPN をコーティングしたものを添加して比較した。OPN を単独で加えると、37.5  $\mu$ /ml でおおよそ90%の inhibitory activity を示した (Fig. 2)。一方、コラーゲン顆粒の表面に OPN をコーティングすると inhibitory activity は逆に低下した<sup>7,8)</sup>。電顕像でもコラーゲン顆粒への結晶の付着・凝集が表面を OPN でコーティングするこ

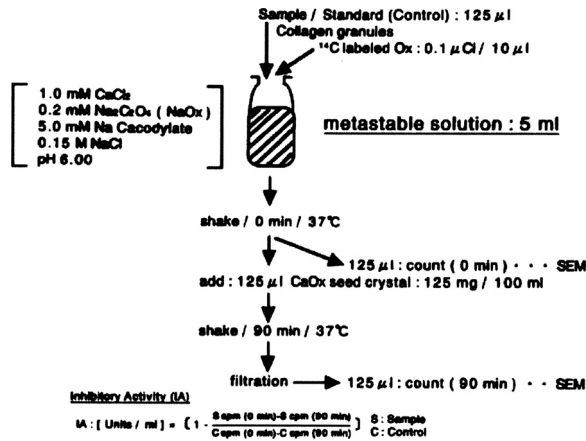


Fig. 1. The modified seed crystal method using collagen granules.

とで明らかに増加した (Fig. 3). 以上より OPN は人工尿中にフリーで存在すると結晶の凝集抑制効果 (inhibitor) を持ち, OPN が何らか基盤に接着した状態では逆に結晶析出が促進 (promoter) されることが示された. OPN の作用のうち, 2) 結晶の尿管上皮細胞への付着の促進についての知見の1つとして Madin Darby canine kidney cell membrane (MDCK) 培養細胞にて Fig. 4 に示すように, COM 細胞表面への付着は OPN を添加すると有意に増加する<sup>9)</sup>ことが

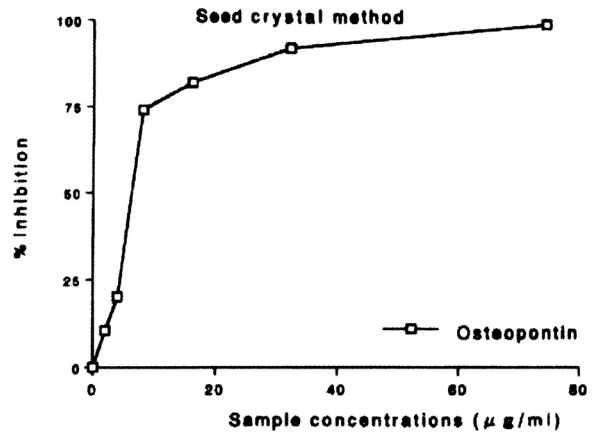


Fig. 2. Effect of osteopontin (OPN) in the seed crystal method. The inhibitory activity of OPN at a concentration of 37.5 μg/ml was 90%.

ある. COM 結晶が曝露されると bikunin, heparanx sulfate (HS), prostaglandin E<sub>2</sub> などと同時に OPN の発現も増加する. 細胞表面への結晶の付着は OPN を添加した状態では有意に増加する (Fig. 4). さらにラット遠位尿管細胞 (NRK-52E) を用い, 尿酸を暴露すると OPN 発現の亢進とともに COM 結晶の細胞への付着も有意に増加する. OPN siRNA を尿管細胞に導入すると, 結晶の細胞への付着は有意に減少し

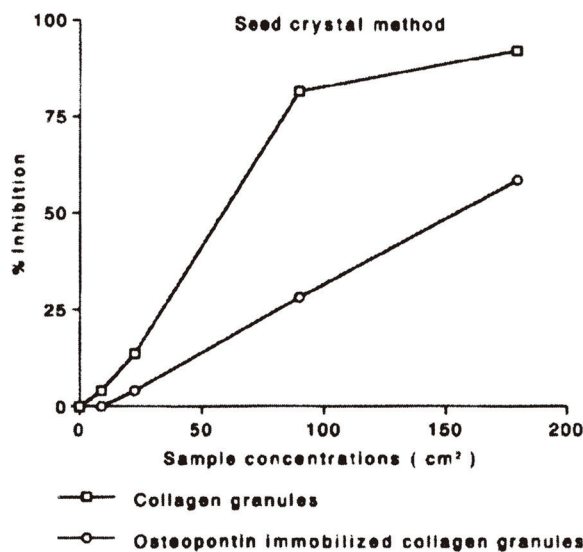
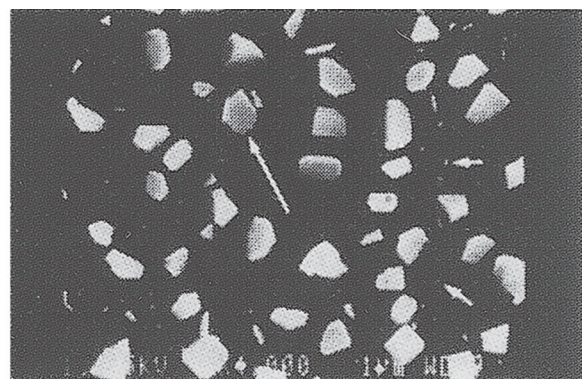
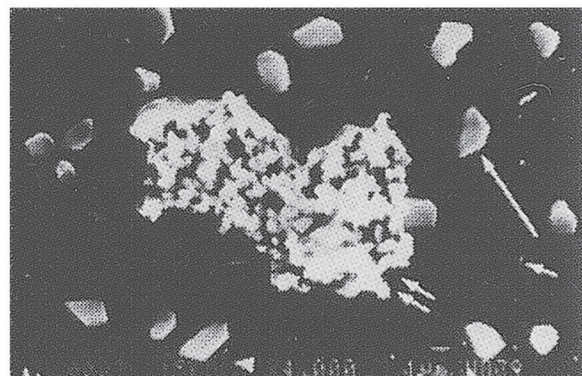


Fig. 3. Effect of collagen granules and OPN-immobilized collagen granules in the seed crystal method. Inhibitory activity of collagen granules with a surface area of 180 cm<sup>2</sup>/5ml was 90%. Inhibitory activity of OPN-immobilized collagen granules (180 cm<sup>2</sup>/5 ml) was 60%.



Collagen granule



OPN immunobilized collagen granule

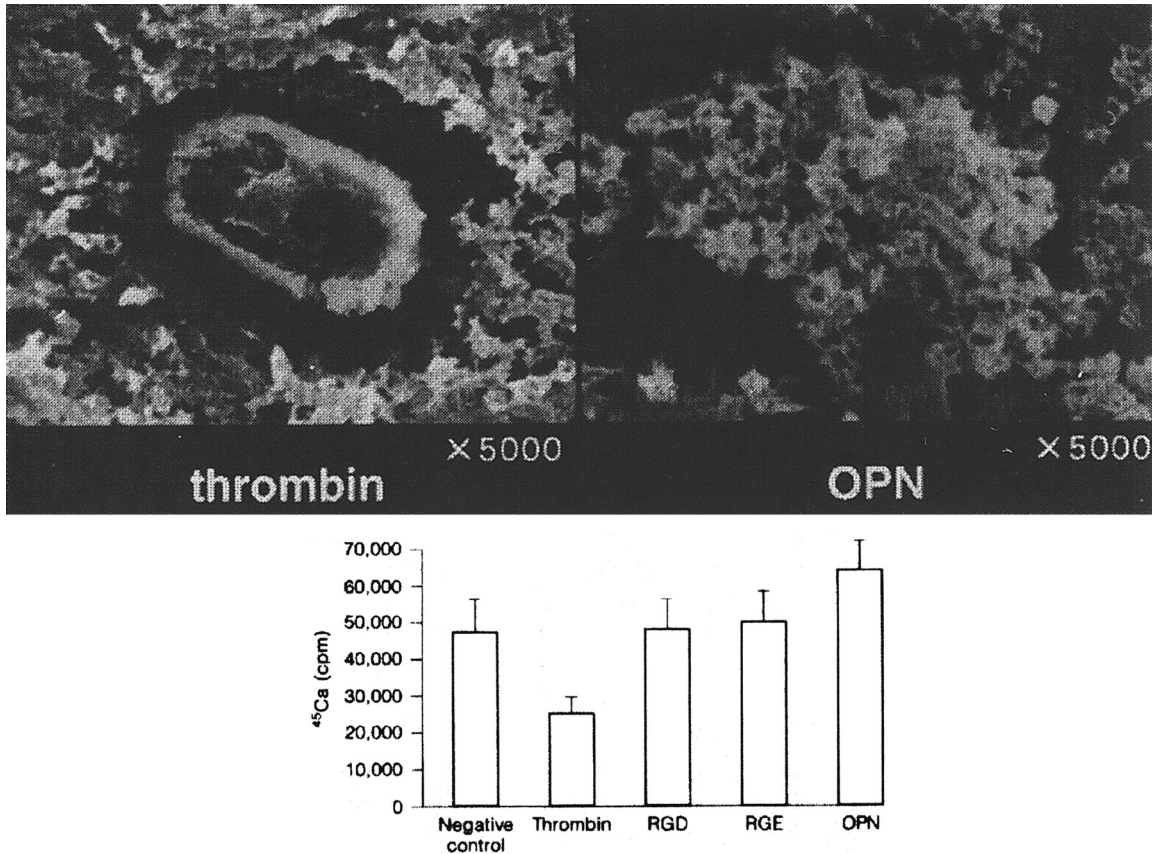


Fig. 4. Difference in the adhesion of crystals between OPN and thrombin by SEM image and comparison of <sup>45</sup>Ca concentrations after the addition of negative control, OPN(10 μg/ml), thrombin (10 U/ml), RGD (Arg-Gly-Asp peptide, 10 μg/ml) and RGE (Arg-Gly-Glu peptide, 10 μg/ml) by scintillation counting.

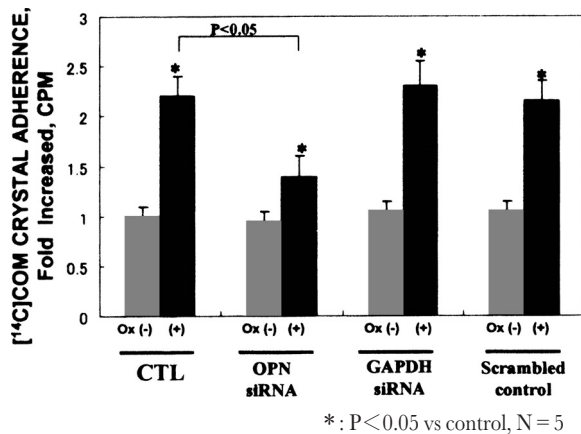


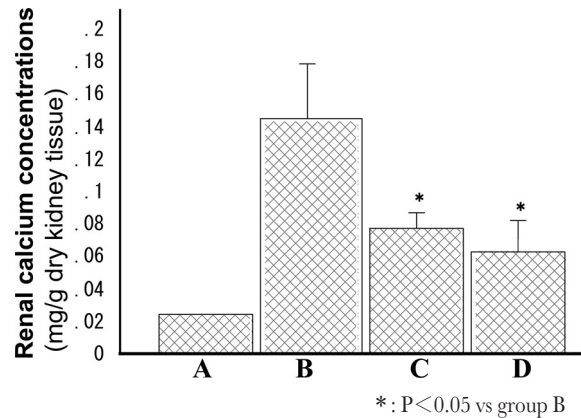
Fig. 5. COM crystal adherence was increased by exposure of the cells to high oxalate concentration and reduced significantly by OPN siRNA transfection to NRK-52E cultured cells.

た (Fig. 5). つまり培養細胞の実験系では OPN が promoter (COM 結晶と細胞の付着を亢進する) として働くことが示唆された。

## 2) In vivo

OPN は 3) 間質への炎症細胞の遊走などの chemical mediator としての作用をもち、前述した作用も合わせた多機能を有するが故、尿路結石形成に対して

inhibitor か promoter かも一元的には説明できない。そこで OPN の *in vivo* での作用に着目し、OPN siRNA 導入による *in vivo* の実験系を作成した。導入試薬である Atelogene™ を用いて腎被膜下注入とリポフェクションを用いた hydrodynamic injection をラット尾静脈より行い OPN siRNA を導入した。Target sequence: 5'AAGGCGCATTACAGCAAACAC 3' (167-187, 87 base downstream from the start codon) Sense Sequence: 5'GGCGCAUUAACAGCAAACACUU 3', Antisense Sequence: 5'GUGUUUGCUGUAAUGCGCCUU 3' (Ambion® siRNA Target Finder) を用い、サイレンシングを評価した<sup>10)</sup>。作成したラットモデルは A 群: コントロール (n=2), B 群: 1.5% エチレンジクロリコール (EG) 自由摂取 (n=6), C 群: リポフェクションを用いた hydrodynamic injection による導入 (n=6), D 群: 腎被膜下注入による導入 (n=6) の 4 群である。C, D 群はいずれも 1.5% EG の自由摂取とした。ラットは 24 週齢雌 Sprague-Dawley (SD) を用いた。In vivo transfection の処置は day 1, 8 に行い、day 15 に sacrifice した。Fig. 6 に各群の原子吸光法による腎組織カルシウム含有量を示す。EG 投与によるカルシウム含有量の増加が、OPN siRNA 導入を行った C, D 群で有意に減少した。ラットに EG を投与し

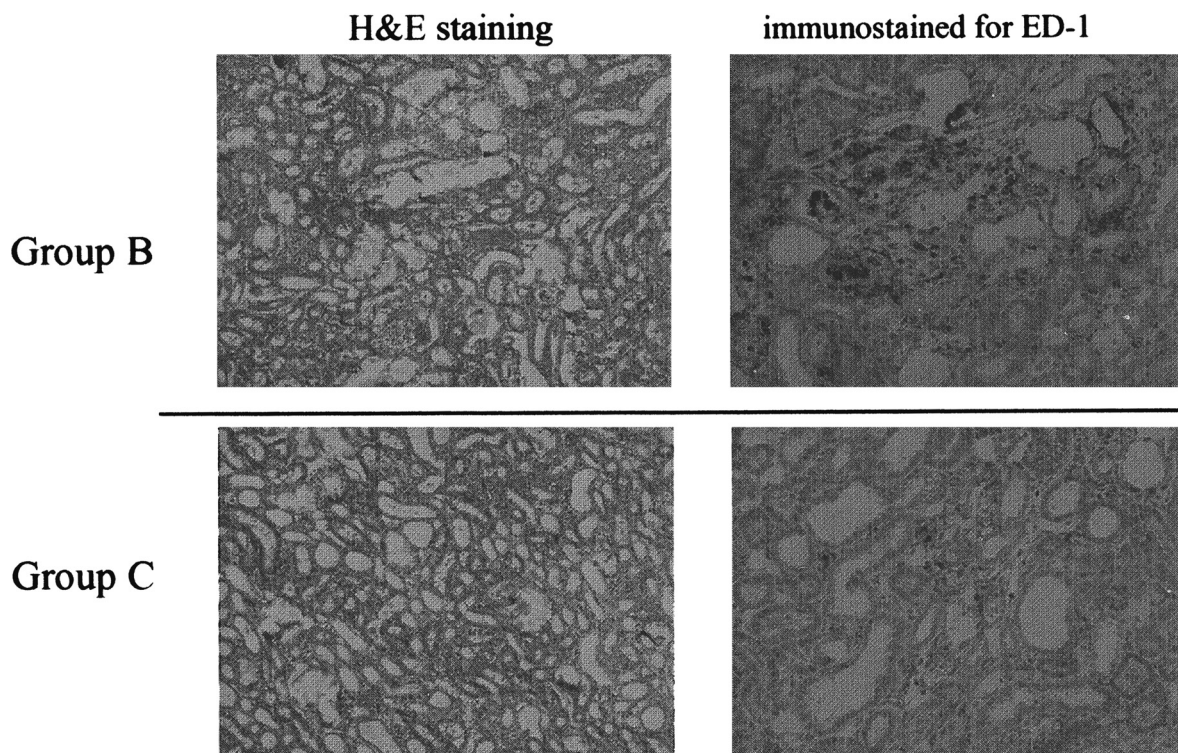


**Fig. 6.** Hyperoxaluria was induced in 6-week-old male Sprague-Dawley rats by administering 1.5% ethylene glycol in drinking water for 3 weeks. Four groups of 6 rats each were studied: group A, untreated control animals; group B, hyperoxaluria without treatment; group C, hyperoxaluria treated hydrodynamic administration of OPN siRNA by lipofection; group D, hyperoxaluria treated renal capsular injection of OPN siRNA using atelocollagen. The renal calcium concentration was higher in groups B, C and D than in group A. The increase of renal calcium concentration induced by hyperoxaluria (group B) was significantly reduced by OPN siRNA transfection (group C and D).

て作成した結石形成モデル<sup>11)</sup>ではあるが, OPN は *in vivo* で全体として結石形成に promoter として作用していることが示唆された。

この OPN の発現を抑制することで, 臨床応用することができないか? その1つとして, Angiotensin II type I receptor blocker (ARB) であるカンデサルタンを

用いてのラット腎結石抑制効果について検討した. 作成したラットモデル (10週齢雄 SD) は A 群: 水道水 (n=10), B 群: 1.0% EG (n=10), C 群: 1.0% EG とカンデサルタン 20 μg/ml EG (n=10), D 群: カンデサルタン 20 μg/ml EG (n=10) を4週間投与した4群である. まず腎組織像の EG 投与群 (group B) と



Group B: 1% EG for 4 weeks, group C: 1% EG + CS (20 mg/ml) for 4 weeks

**Fig. 7.** (Left): Sections of a kidney from the rat in group B and C. Calcium oxalate crystals in the tubular lumen were decreased in group C. H & E staining, reduced from  $\times 200$ . (Right): Kidney sections immunostained for ED-1, reduced from  $\times 200$ . ED-1-positive cells, corresponding to monocytes/macrophage, are present in the renal interstitium. In group C, ED-1-positive cells were reduced.

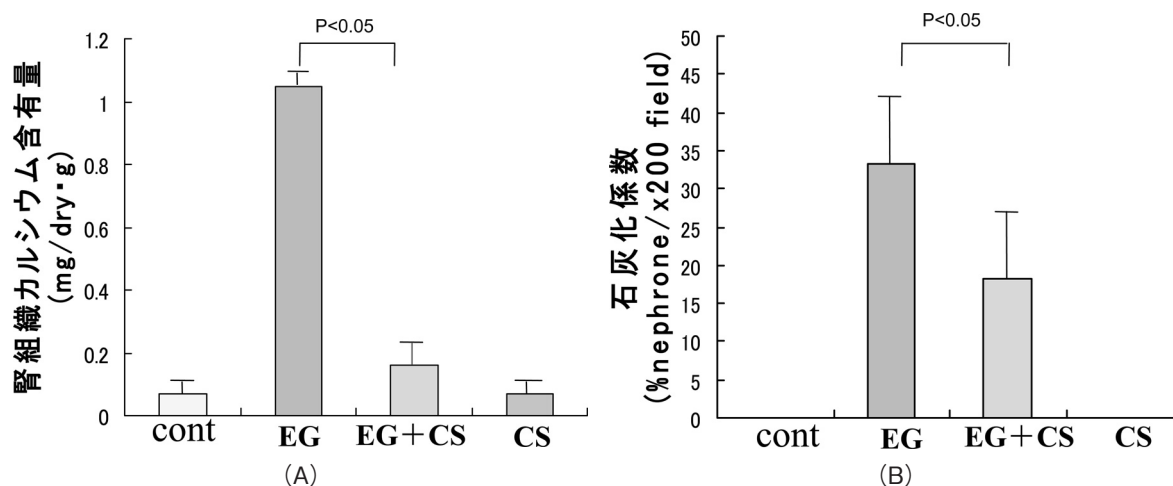


Fig. 8. (A) renal calcium concentration. (B) calcium oxalate crystal deposits (% nephron/ × 200 fields). Group A : control, group B : EG, group C : EG + CS (Candesartan), group D : CS. High levels of renal calcium concentrations and calcium oxalate crystal deposits in group B were significantly decreased in group C.

Table 1. Urinary and serum concentrations of various substances

	Mean oarameters ± SD at 4 weeks			
	Group A	Group B	Group C	Group D
Renal calcium concentrations (mg/g dry kidney tissue)	0.07 ± 0.01	1.05 ± 0.01*	0.16 ± 0.02*§	0.07 ± 0.01
Calcium oxalate constal deposits score (% nephone/ × 200 field)	0	3.32 ± 10.2*	18.2 ± 8.0*§	0
EDI (average numbers/ × 200 field)	0	91.1 ± 31.8*	36.7 ± 19.4*§	0
Renal angiotensin II (pg/mg protein)	0.30 ± 0.01	0.35 ± 0.01*	0.60 ± 0.03*§	0.69 ± 0.02*
Renal OPN (pg/mg protein)	69.8 ± 6.9	230 ± 22.8*	104.0 ± 43*§	71.2 ± 5.6
Malondialdehyde (nmol/mg protein)	0.34 ± 0.05	0.55 ± 0.05*	0.43 ± 0.06*§	0.39 ± 0.06

\* : P<0.05 vs group A, § P<0.05 vs group C. Group A : control, group B : 1% EG for 4 weeks, group C : 1% EG + CS (20 mg/ml) for 4weeks, group D : CS (20 mg/ml) for 4 weeks.

EG + ARB 投与群 (group C) の比較を Fig. 7 に示す. Group C では尿細管でのクリスタルの沈着が減少し, 間質の ED1 陽性細胞も group C で明らかな減少をみた. 腎組織カルシウム含有量および石灰化係数 (H & E stain 標本200倍視野でネフロン総数のうち管腔内に結晶が付着しているネフロンの割合) をみると, ともに EG 投与にて著明に増加したが, ARB 投与にて有意に減少した (Fig. 8). その他の結果も含めて Table 1 に示す<sup>10)</sup>.

腎組織内 OPN, Malondialdehyde 濃度は有意に減少した.

### 考 察

Angiotensin II は酸化ストレスにも関与していて NADPH oxidase の活性化から酸素活性ラジカルを産生させる<sup>12)</sup>. この NADPH oxidase は尿酸の曝露などにより活性化され, スーパーオキシド ( $\cdot O_2^-$ ) の産生, さらに OPN の亢進につながる. この OPN の亢進にはレニンアンギオテンシン系の関与もある.

結石形成ラットでは腎尿細管に様々なストレスが影

響し<sup>13)</sup>, 活性酸素の増加, レニンアンギオテンシン系の亢進より OPN の発現が増加する. ARB の投与により Angiotensin II を介する経路がブロックされるため, その分 OPN の発現が抑制され, 結晶の沈着の減少と腎カルシウム含有量が低下したのではないかと

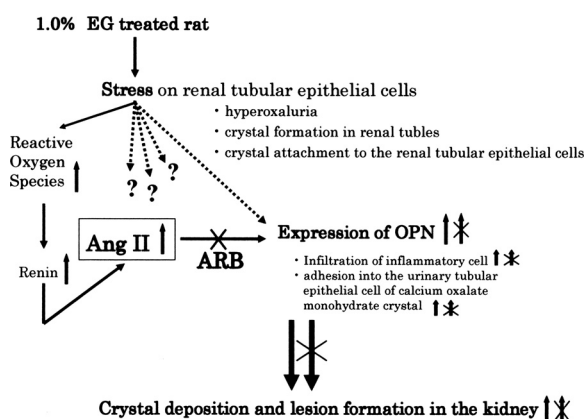


Fig. 9. Hypothetical schema depicting the multiple actions of OPN that may be required to adequately inhibit the intrarenal deposition of calcium oxalate crystals.

推察された (Fig. 9).

Angiotensin II は血管に作用する他に、腎障害および腎臓病の進行に影響を与える免疫調節因子も活性化させると報告されている<sup>14)</sup>。さらに Angiotensin II は RANTES (regulated on activation normal T-cell expression and secreted), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) および OPN を up-regulation させ、サイトカイン、ケモカインの誘導より、腎内での monocytes/macrophages の浸潤が促進される。これらは腎尿細管間質の機能、構築にも影響をもつ。ARB による Angiotensin II の抑制は腎尿細管間質の障害を緩和し、サイトカインとマトリックス蛋白質の発現を減少させる<sup>15)</sup>。

臨床応用について考えてみると ARB (カンデサルタン) はすでに市販されている薬剤であるが、今回の結果をうけて実際にヒトに投与した場合、尿路結石の予防効果として期待できるのか？ それは今後まだまだデータの蓄積が必要である。また NADPH oxidase が産生するスーパーオキシドは、second messenger の役割を担って OPN の発現を亢進させることから、さらに 2 種の薬剤も inhibitor として導き出される。フリーラジカルスカベンジャーである Nicaraven, Edaravone と Rho-kinase inhibitor である。後者はフリーラジカルスカベンジャーとしての活性はないが、好中球凝集、遊走、活性酸素産生の抑制作用をもち、尿路結石形成の inhibitor としての効果も期待できるかも知れない。

過剰な尿酸イオン (Ox) や尿酸カルシウム結晶の尿細管上皮への曝露は多様なストレス性の反応を生み出す。この代表が OPN や MCP-1 の発現の亢進であり、尿路結石の初期段階である尿細管腔での結晶形成に参与している<sup>16)</sup>。このように尿細管上皮から間質に遊走された炎症細胞より分泌された様々な酵素やサイトカイン、ケモカインにより結晶にマトリックス成分が取り込まれて成長し、結石形成に移行すると考えられている。尿路結石を予防するという観点からいうと、尿細管上皮細胞から惹起される過剰な炎症を抑制することも重要な機序の 1 つと考えられた。

## 結 語

尿路結石の形成機序に関与する尿中高分子蛋白のうち OPN に関するこれまでに得られた知見と臨床応用への可能性について考察した。

## 文 献

1) Wesson JA, Johnson RJ, Mazzali M, et al.: Osteopontin is a critical inhibitor of calcium oxalate crystal formation and retention in renal tubules. *J Am Soc Nephrol* **14**: 139-147, 2003

2) Khan SR: Role of renal epithelial cells in the initiation of calcium oxalate stones. *Nephron Exp Nephrol* **98**: 55-60, 2004

3) Yasui T, Fujita K, Asai K, et al.: Osteopontin regulates adhesion of calcium oxalate crystals to renal epithelial cells. *Int J Urol* **9**: 100-109, 2002

4) Robertson WG, Peacock M and Nordin BE: Inhibitors of the growth and aggregation of calcium oxalate crystals *in vitro*. *Clin Chim Acta* **43**: 31-37, 1973

5) Ligabue A, Fini M and Robertson WG: Influence of urine on "in vitro" crystallization rate of calcium oxalate: determination of inhibitory activity by a [<sup>14</sup>C] oxalate technique. *Clin Chim Acta* **98**: 39-46, 1979

6) Ryall RL, Ryall RG and Marshall VR: Interpretation of particle growth and aggregation patterns obtained from the Coulter counter: a simple theoretical model. *Invest Urol* **18**: 396-405, 1981

7) Umekawa T, Iguchi M and Kurita T: The effect of osteopontin immobilized collagen granules in seed crystal method. *Urol Res* **29**: 282-286, 2001

8) Konya E, Umekawa T, Iguchi M, et al.: The role of osteopontin on calcium oxalate crystal formation. *Eur Urol* **43**: 564-571, 2003

9) Yamate T, Kohri K, Umekawa T, et al.: Interaction between osteopontin on Madin Darby canine kidney cell membrane and calcium oxalate crystal. *Urol Int* **62**: 82-86, 1999

10) Umekawa T, Hatanaka Y, Kurita T, et al.: Effect of Angiotensin receptor blockage on osteopontin expression and calcium oxalate crystal deposition in rat kidneys. *J Am Soc Nephrol* **15**: 635-644, 2004

11) Kharn SR, Johnson JM, Peck AB, et al.: Expression of osteopontin in rat kidneys: induction during ethylene glycol induced calcium oxalate nephrolithiasis. *J Urol* **168**: 1173-1181, 2002

12) Ito H, Mukoyama M, Pratt RE, et al.: Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* **91**: 2268-2274, 1993

13) Khan SR: Hyperoxaluria-induced oxidative stress and antioxidants for renal protection. *Urol Res* **33**: 349-357, 2005

14) Antus B, Exton MS and Rosivall L: Angiotensin II: a regulator of inflammation during renal disease? *Int J Immunopathol Pharmacol* **14**: 25-30, 2001

15) Cao Z and Cooper ME: Role of angiotensin II in tubulointerstitial injury. *Semin Nephrol* **21**: 554-562, 2001

16) Umekawa T, Tsuji H, Uemura H, et al.: Superoxide from NADPH oxidase as second messenger for the expression of osteopontin and monocyte chemoattractant protein-1 in renal epithelial cells exposed to calcium oxalate crystals. *BJU Int* **104**: 115-120, 2009

(Received on October 14, 2010)  
(Accepted on October 18, 2010)