

財団法人日中医学協会

2008 年度共同研究等助成金・調査・共同研究報告書

平成 21 年 3 月 11 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 安井 孝周 
所属機関名： 名古屋市立大学大学院医学研究科
所属部署： 腎・泌尿器科学分野 職名： 講師
所在地： 〒467-8601
名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄 1
電話： (052) 852-5511 内線： 8266

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

尿路結石に特徴的な一塩基多型による人種差の検討

3. 成果の概要 (100 字程度)

尿路結石患者に特徴的な遺伝子多型をオステオポンチン (OPN) で同定し、遺伝子多型により、OPN プロモーター活性が変化することを確認した。さらに、全ゲノムの網羅的探索によって尿路結石と強い関連を示す、4 番染色体長腕および 17 番染色体短腕の 2 領域を同定した。

(中国人共同研究者 高兵が 2008 年 5 月 31 日～8 月 2 日来日し、上記研究を共同して行い、成果を、第 11 回国際尿路結石症シンポジウムで発表した。)

※ 発表論文等

Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for urolithiasis.(投稿準備中)

4. 研究組織

日本側研究者氏名：安井 孝周 職名： 講師

所属機関：名古屋市立大学大学院医学研究科 部署：腎・泌尿器科学分野

中国側研究者氏名： 高 兵 職名： 教授

所属機関：瀋陽医学院 部署：細胞生物与遺伝学研究室

尿路結石に特徴的な一塩基多型による人種差の検討

研究者氏名 安井 孝周
所属機関 名古屋市立大学大学院医学研究科
腎・泌尿器科学分野 講師
共同研究者名 高兵

要旨

尿路結石は遺伝因子に食生活などの生活習慣である環境因子が重なり、発症すると考えられる。遺伝子の一塩基多型 (SNPs) は個体差を形成し、多因子疾患の原因となることが報告されている。疾患に相関する特定遺伝子の SNPs が判別出来れば、個体レベルでの発症リスクを推測し、疾患の早期診断、予防に有用である。本研究では、OPN の SNPs 解析により結石発生のリスクとの関係を検討し、機能解析を中国人共同研究者とともに行った。また、ピロリン酸のトランスポーターである ANKH 遺伝子でも検討した。さらに、ゲノムワイドな網羅的探索によって、新規の関連遺伝子領域を同定した。

OPN の SNPs では人種差を同定できなかったが、プロモーター解析によって結石と健常者に特徴的な SNPs によって発現変化が生じることを確認し、機能に変化が生じることが推察された。ANKH では特徴的な SNPs を見つけられなかった。上記研究を、中国人共同研究者 高兵が 2008 年 5 月 31 日～8 月 2 日来日し、共同して行い、成果を、第 11 回国際尿路結石症シンポジウムで発表した。大規模なゲノムワイドに網羅的解析を行い、日本人において尿路結石症と強い関連を示す、4 番染色体長腕および 17 番染色体短腕の 2 領域を同定した。今後、遺伝子領域の中で、特定遺伝子を同定し、機能解析を行うことと、各遺伝子型における再発率を検討することで、遺伝子診断への応用が期待できる。

Key Words 尿路結石, オステオポンチン, 遺伝子多型, ゲノムワイド

緒言:

尿路結石は遺伝因子に食生活などの生活習慣である環境因子が重なり、発症すると考えられる。尿路結石症の生涯罹患率は急増し、我が国では 100 人中 6 人、欧米では 20 人にも達する国もみられ、生産年齢の男性に多く、その成因の究明と再発予防法の確立は急務であるが、遺伝子レベルに研究が進んでからも画期的な再発予防法は開発されていない。

オステオポンチン (OPN) はカルシウム結石のマトリクスとして同定され、結石モデルラットでは結石形成に先行して発現し、尿細管細胞と蓚酸カルシウム結晶の接着、結晶の成長に関与し、結石形成に重要な役割を果たすと考えられている。

遺伝子の一塩基多型 (SNPs) は個体差を形成し、多因子疾患の原因となることが報告されている。疾患に相関する特定遺伝子の SNPs が判別出来れば、個体レベルでの発症リスクを推測し、疾患の早期診断、予防に有用である。本研究では、OPN の SNPs 解析により結石発生のリスクとの関係を検討した。また、ピロリン酸のトランスポーターである ANKH 遺伝子でも検討した。

さらに、同定されていない遺伝子を含めたゲノムワイドに遺伝子解析を行うため、タグ SNP を用いた網羅的探索法にて検討した。

対象と方法:

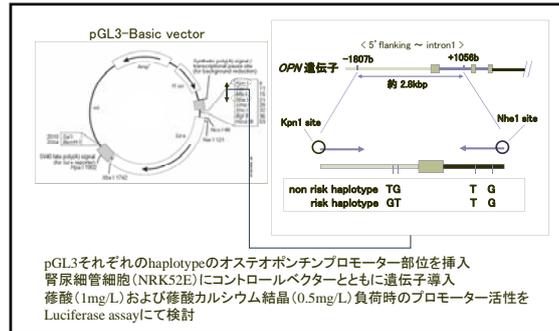
SNP の同定と解析

カルシウム結石患者 126 名(平均 57.6±13.5 歳、男性 93 名、女性 33 名)と結石既往のない健常者 214 名(平均 68.6±11.8 歳、男性 165 名、女性 49 名)を対象とした。まず、99 例で血液よりゲノム DNA を抽出し、OPN 遺伝子の全配列を決定した。連鎖不均衡解析を行い、結石患者に特徴的な haplotype

tagging SNPs (htSNPs)について全例で SNPs を検討、解析した。ANKH では全ゲノムの遺伝子配列を同定し、同様に解析を行った。

OPN プロモーター活性の検討

特徴的な htSNPs について、蔞酸 (1mM) および蔞酸カルシウム一水和物 (COM) 結晶 (500µg/ml) 添加時のプロモーター活性を検討した。それぞれの htSNPs について、-1807bp から 1056bp 領域をプラスミド pGL3 basic vector に組み込み、HK-2 細胞 (ヒト腎尿細管細胞由来) にコントロールプラスミド (pRL-TK) とともに co-transfection した。蔞酸 (1mM) または蔞酸カルシウム一水和物 (COM) 結晶 (500µg/ml) を添加し、OPN プロモーター活性を 1,3,6,12,24 時間後に Luciferase assay にて経時的に検討した。



結石関連遺伝子のゲノムワイドな網羅的探索

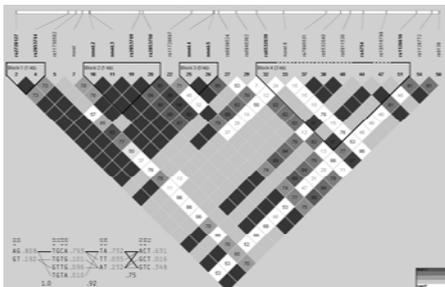
カルシウムを主成分とする尿路結石の形成機序は、食事などの環境因子に加えて、遺伝因子が重要であると考えられる。遺伝因子としては、「個人差程度の違い」である遺伝子多型 (SNP) が、いくつも複雑に関連して疾患が発症していると考えられている。ハプロタイプブロックの領域には、「タグ SNP」と呼ばれる、その領域を代表する SNP が存在しており、約 10 万ヶ所のタグ SNP をタイピングすることで、尿路結石関連遺伝子の一次スクリーニングを行い、インフォームドコンセントのうえ、収集した結石患者のゲノム遺伝子を、1000 名以上で二次スクリーニングを行った。

結果:

SNP の同定と解析

61 ヶ所の SNPs を確認し、連鎖不均衡解析にて 4 つの block を同定した (図 1)。Block 2 で結石患者および健常者に特異的なハプロタイプを同定した。結石患者と健常者の遺伝子型を比較すると、ハプロタイプ G-T-T-G は結石患者に多く ($p=0.0227$ odds 比 1.676)、ハプロタイプ T-G-T-G は健常者に多く ($p=0.016$ odds 比 0.351) 見られた。日本人と中国人での差異については明らかにならなかった。

99名のOPN SNPについて連鎖不均衡解析を行った。太枠の内部がhaplotype blockを示し、太字の SNP 番号がブロック内のhaplotype tagging SNP (htSNP)を示す。



尿路結石患者 (126名) と健常者 (214名) でBlock2にあるhaplotypesについて解析を行った。 GTTGは結石患者に多く、TGTGは健常者 (非結石患者) に多い**。

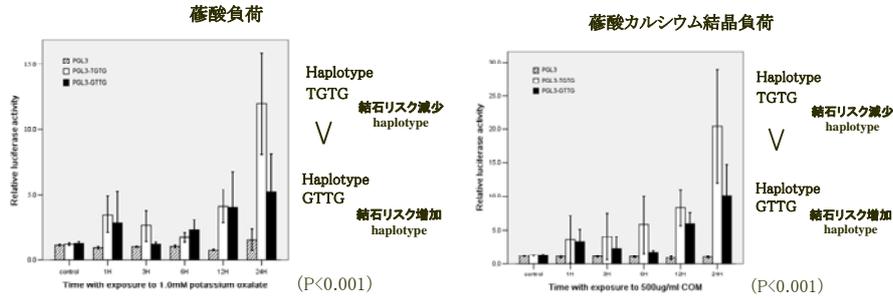
Block 2 Haplotypes (SNP Frequency 10-11-19-20)	Frequency	Cases (n=126)	Controls (n=214)	OR	95% CI	Chi square	P value
TGCA	0.756	192.0 / 60.0	321.9 / 106.1	1.054	0.659-1.364	0.080	0.7777
GTTG	0.132	43.0 / 209.0	46.8 / 381.2	1.676	1.072-2.621	5.189	0.0227*
TGTG	0.088	11.0 / 241.0	49.2 / 378.8	0.351	0.179-0.689	9.978	0.0016**
TGCG	0.012	4.0 / 248.0	3.8 / 424.2	1.801	0.438-7.395	0.667	0.414

* $P<0.05$. ** $P<0.01$.

ANKH 遺伝子で、SNPs を同定したが、結石患者と健常者に特徴的な SNPs は同定できなかった。

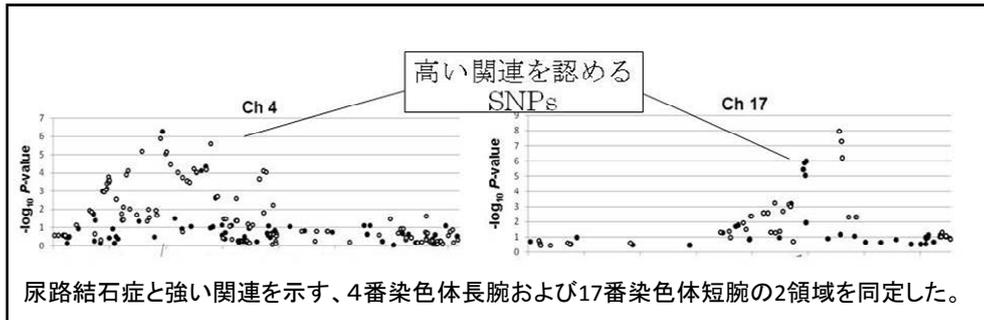
OPN プロモーター活性の検討

Luciferase assay では蓆酸および COM 結晶の刺激により、OPN プロモーター活性は経時的に上昇し、24 時間後にピークを認めた。ハプロタイプ T-G-T-G はハプロタイプ G-T-T-G と比較して、蓆酸または COM 結晶刺激による、OPN プロモーター活性が有意に上昇していた。



結石関連遺伝子のゲノムワイドな網羅的探索

多因子疾患として OPN 以外の遺伝因子を探索するため、以下の如く尿路結石症としては世界初となるゲノムワイド解析を行った。同定されていない関連遺伝子も含めた全ゲノムの網羅的探索として、尿路結石患者と健常者の大規模ゲノムワイド関連解析を行い、日本人において尿路結石症と強い関連を示す、4 番染色体長腕および 17 番染色体短腕の 2 領域を同定した(投稿中)。



考 察 :

カルシウム結石は単一の遺伝子異常で説明ができていないが、近年、遺伝子多型(一塩基多型、single nucleotide polymorphism: SNP)を中心とした解析が行われ、カルシウム代謝に関係する Vitamin D 受容体、カルシウム感受性受容体、ウロキナーゼ等について報告されてきている。

本研究ではカルシウム結石患者と健常者を比較し、結石マトリクスである OPN について有意に、ハプロタイプ G-T-T-G では結石発症のリスクが高く、ハプロタイプ T-G-T-G では健常者(非結石患者)である可能性が高いことを示した。さらに、それぞれのハプロタイプでプロモーター活性が変化することを確認した。採血による遺伝子解析によって、特定のハプロタイプで尿路結石の発症リスクが診断できる可能性があり、再発予防に有用であることが示唆された。

ゲノムワイドな網羅的探索で得られた関連遺伝子領域については、特定遺伝子を同定し、今後機能解析と、尿路結石患者と健常者における再発について検討することで、新規関連遺伝子の同定、再発リスク診断が可能となる将来性が期待される。

参考文献

1. Okada A, Yasui T, Hamamoto S, Hirose M, Kubota Y, Itoh Y, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. Genome-Wide Analysis of Genes Related to Kidney Stone Formation and Elimination in the Calcium Oxalate Nephrolithiasis Model Mouse: Detection of Stone-Preventive Factors and Involvement of Macrophage Activity. J Bone Miner Res. 2008 Dec 29. [Epub ahead of print]

2. Gao B, Yasui T, Itoh Y, Li Z, Okada A, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. Association of osteopontin gene haplotypes with nephrolithiasis. *Kidney Int.* 72(5):592-8, 2007.
3. Gao B, Yasui T, Itoh Y, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. A polymorphism of matrix Gla protein gene is associated with kidney stones. *J Urol.* 177(6):2361-5, 2007.
4. Gao B, Yasui T, Okada A, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. A polymorphism of the osteopontin gene is related to urinary calcium stones. *J Urol.* 174(4 Pt 1):1472-6, 2005.
5. Vezzoli G, Soldati L, Proverbio MC, Adamo D, Rubinacci A, Bianchi G, Mora S: Polymorphism of vitamin D receptor gene start codon in patients with calcium kidney stones. *J Nephrol.* 158-164, 2002.
6. Nishijima S, Sugaya K, Naito A, Morozumi M, Hatano T, Ogawa Y: Association of vitamin D receptor gene polymorphism with urolithiasis. *J Urol.* 167: 2188-2191, 2002.
7. Vezzoli G, Tanini A, Ferrucci L, Soldati L, Bianchini C, Franceschelli F, Malentacchi C, Porfirio B, Adamo D, Terranegra A, Falchetti A, Cusi D, Bianchi G, Brandi ML: Influence of calcium-sensing receptor gene on urinary calcium excretion in stone-forming patients. *J Am Soc Nephrol.* 13: 2517-2523, 2002

学会発表 :

Takahiro Yasui, Bing Gao, Yasunori Itoh, Masayuki Usami, Atsushi Okada, Shuzo Hamamoto, Takahiro Kobayashi, Yasuhiko Hirose, Masahito Hirose, Keiichi Tozawa, Kenjiro Kohri. Haplotypes in the *osteopontin* gene associate with nephrolithiasis and without bone mineral density. 11th International Symposium on Urolithiasis (Nice, France) Sep 2-5, 2008 (presentation Sep 4, 2008)

作成日 : 2009年3月8日